Denisia 13 | 17.09.2004 | 497-513

Die Differenzierung von *Anopheles*-Zwillingsarten (Diptera: Culicidae)[1]

H. KAMPEN

Abstract: The differentiation of *Anopheles* sibling species (Diptera: Culicidae). — Despite the lack of morphological differences sibling species may have their own characteristic behaviour, ecologies and vector competences. In particular, malaria vectors are quite often members of species complexes along with non-vector species. Indeed, the genus *Anopheles* first drew attention to the existence of sibling species due to the phenomenon of 'anophelism without malaria'. Therefore, a correct species identification is essential for vector control. For decades, it has been worked on the development of methods that were meant to render the differentiation of vectors from their non-vector sibling species safer, faster and less laborious. In this review, the most important approaches to the identification of *Anopheles* sibling species are presented, beginning with classical cross breeding experiments via 'cytotaxonomy' and 'zymotaxonomy', that have been the standard methods for a long time, up to modern molecular biology techniques. Owing to their historical relevance for the scientific research on sibling species and their importance for malaria in Europe and Africa, the *An. maculipennis* and the *An. gambiae* complexes receive particular attention.

Key words: *Anopheles*, species complex, sibling species, differentiation.

1 Artenkomplexe und Zwillingsarten

Nach der Definition von MAYR (1967) sind biologische Arten durch eine Reproduktionsbarriere voneinander getrennte Populationen. In Anpassung an die regionalen Besonderheiten bilden solche Populationen häufig unterschiedliche morphologische Merkmale aus. Diese sind aber nicht immer ausreichend, um eine Art zu definieren, vor allem, wenn es sich um eher graduelle Variationen handelt als um diskrete Unterschiede.

Sehr nah verwandte Arten, die zwar reproduktiv voneinander isoliert sind, aber keine oder nur minimale morphologische Unterschiede in bestimmten Entwicklungsstadien aufweisen, werden als Zwillingsarten oder kryptische Arten bezeichnet. Der synonyme Terminus ‚Geschwisterart' wurde bereits 1930 von RAMME eingeführt, wird aber heute nicht mehr verwendet, um Verwechslungen mit dem Begriff ‚Schwesterart' zu vermeiden. In der angelsächsischen Fachliteratur haben die Zwillingsarten als ‚sibling species' Eingang gefunden (MAYR 1942).

Eine Gruppe von Zwillingsarten wird Artenkomplex genannt. Trotz ihrer morphologischen Übereinstimmung besitzen die verschiedenen Arten eines Komplexes wohldefinierte und artspezifische ökologische, physiologische und genetische Eigenschaften, die z. B. in ihren Brutplatzpräferenzen, ihren Verhaltensweisen oder ihren Vektorkompetenzen zum Ausdruck kommen (Tab. 1).

Gerade was die Epidemiologie von Infektionskrankheiten, die durch Arthropoden übertragen werden, angeht, spielt die Existenz isomorpher Vektorarten eine entscheidende Rolle. So hatte man in Europa anfangs des 20. Jahrhunderts, als noch nichts von Artenkomplexen bekannt war, mit einem Phänomen zu tun, das heute als „Anophelismus sine malaria" bezeichnet wird (vgl. FANTINI 1994). Es beschreibt die Situation, dass autochthone Malariaerkrankungen in ganz bestimmten Gebieten, vorwiegend in Küstenregionen, auftraten, während der vermeintliche Vektor, *An. maculipennis*, sowohl in malariaverseuchten als auch in malariafreien Gebieten vorkam. Eingehendere Untersuchungen führten bald zu der Erkenntnis, dass deutliche ökologische Unterschiede zwischen den verschiedenen geographischen Populationen von *An. maculipennis* existierten. Nachdem man diesen Ökotypen sogar konsistente morphologische Abweichungen in der Ausbildung der Eihülle zuordnen konnte, sprach man nunmehr von sieben *maculipennis*-‚Rassen'. Kreuzungsexperimente erbrachten später den Beweis, dass die Rassen weitgehend reproduktiv voneinander isoliert waren und ein Genfluss zwischen ihnen entweder stark reduziert oder gar nicht vorhanden war.

Seit die Existenz von Artenkomplexen bekannt ist, wird nach sicheren, schnellen und praktikablen Methoden gesucht, um eine Differenzierung von Zwillingsarten vornehmen zu können (WHITE 1984). Während sich einige dieser Techniken in der Routine durchgesetzt haben, kamen andere niemals über den Entwicklungszustand hinaus. Oft waren sie nicht verlässlich genug, sehr zeit- und arbeitsaufwendig, nur auf bestimmte Entwicklungsstadien anwendbar oder verlangten langjährige Übung und Erfahrung. Moderne molekularbiologische Tests sind

[1] Herrn Prof. Dr. Horst Aspöck zum 65. Geburtstag gewidmet.

mittlerweile effiziente Alternativen, heben sie doch die meisten Nachteile der klassischen Identifizierungstechniken auf.

Das Phänomen der Zwillingsartenbildung ist besonders gut für die *Anopheles*-Mücken untersucht, die weltweit mit ca. 430 Spezies vertreten sind. Etwa 70 von ihnen gelten unter natürlichen Bedingungen als Malariaüberträger, aber nur 40 sind epidemiologisch von Bedeutung (SERVICE & TOWNSON 2002). Viele Malariavektoren sind neben isomorphen Nichtvektoren in Artenkomplexen versteckt. Wichtige Artenkomplexe mit Malariavektoren sind in Tabelle 2 aufgelistet. Von ihnen sollen im Folgenden der An. *maculipennis*-Komplex (An. *maculipennis* s.l.[2]) und der An. *gambiae*-Komplex (An. *gambiae* s.l.) näher vorgestellt werden.

1.1 Der *Anopheles maculipennis*-Komplex

Der An. *maculipennis*-Komplex wurde erstmals 1927 von VAN THIEL beschrieben. Nach WHITE (1978) sowie BARR & GUPTAVANIJ (1988) enthält er neun paläarktische und fünf nearktische Zwillingsarten.

Paläarktische Arten (Eurasien, Nordafrika): An. *maculipennis* s.str.[3] MEIGEN 1818, An. *sacharovi* FAVRE 1903, An. *labranchiae* FALLERONI 1926, An. *messeae* FALLERONI 1926, An. *atroparvus* VAN THIEL 1927, An. *melanoon* HACKETT 1934, An. *beklemishevi* STEGNII & KABANOVA 1976, An. *martinius* SHINGAREV 1926, An. *sicaulti* ROUBAUD 1935.

Nearktische Arten (Nordamerika): An. *occidentalis* DYAR & KNAB 1906, An. *aztecus* HOFFMANN 1936, An. *freeborni* AITKEN 1939, An. *earlei* VARGAS 1943, An. *hermsi* BARR & GUPTAVANIJ 1988.

Die ersten sieben der neun aufgelisteten paläarktischen Arten sind in Europa heimisch, die letzten beiden in Mittelasien bzw. Nordafrika (JETTEN & TAKKEN 1994). Die größte Verbreitung hat An. *messeae*, der in ganz Zentraleuropa und weiten Teilen der früheren Sowjetunion vorkommt. An. *maculipennis* s.str. und An. *atroparvus* leben, z. T. sympatrisch, in fast ganz Europa, während An. *labranchiae*, An. *sacharovi* und An. *melanoon* im Wesentlichen in den Küstenregionen des Mittelmeerraumes und des Schwarzen Meeres zu finden sind (COLUZZI 1970). Das Verbreitungsgebiet von An. *beklemishevi* dehnt sich von Skandinavien über das östliche Europa bis nach Russland aus (LOKKI et al. 1979; STEGNIY 1982; JAENSON et al. 1986). Bei An. *martinius* und An. *sicaulti* handelt es sich um nichteuropäische Arten, die in Mittelasien bzw. Nordwestafrika vorkommen. Letztere wird nicht uneingeschränkt als echte Art betrachtet, sondern vielfach nur als lokale Variante von An. *atroparvus* (z. B. DE ZULUETA et al. 1983).

Als zehnte paläarktische Spezies des An. *maculipennis*-Komplexes wird wegen seines besonderen Eiphänotyps nicht selten An. *subalpinus* angeführt. Verschiedenen zytogenetischen Studien zufolge soll es sich aber tatsächlich nur um eine alternative Form von An. *melanoon* handeln (WHITE 1978). Nichtsdestoweniger zeigten CIANCHI et al. (1987), dass An. *subalpinus* mit Hilfe von Isoenzymen von An. *melanoon* differenziert werden kann. Neuere DNA-Analysen deuten wiederum auf Synonymität mit An. *melanoon* hin (LINTON et al. 2002; KAMPEN 2004a).

An. *labranchiae* und An. *sacharovi* waren zu Zeiten endemischer Malaria in Europa die gefährlichsten Vektoren (JETTEN & TAKKEN 1994). Beide Arten zeigen eine ausgesprochene Präferenz für humanes Blut, akzeptieren aber auch Haus- und Weidetiere als Blutwirte. Noch heute spielt An. *sacharovi* eine bedeutende Rolle bei der Übertragung von *Plasmodium vivax* im asiatischen Teil der Türkei (ÇAĞLAR & ALTEN 2000). Andere Arten des Komplexes wurden ebenfalls als Malariaüberträger beschrieben, doch scheint für sie der Mensch nur dann eine Bedeutung als Blutwirt zu haben, wenn tierische Wirte selten und die Mückendichten sehr hoch sind.

Die nearktischen Arten des An. *maculipennis*-Komplexes sind vorwiegend im Westen Nordamerikas heimisch und überschneiden sich in ihren Verbreitungsgebieten nur wenig (WHITE 1978; BARR 1988). An. *earlei* kommt im Süden Kanadas und im Norden der USA transkontinental vom Atlantischen bis zum Pazifischen Ozean vor, während die anderen Arten nur westlich der Rocky Mountains zu finden sind. An. *freeborni* besiedelt

[2] s.l. = sensu lato (im weiteren Sinne)
[3] s.str. = sensu stricto (im engeren Sinne)

Tab. 1: Wichtige Charakteristika der Zwillingsarten des *An. gambiae*-Komplexes.

	Verbreitung	**Stechverhalten**	**Vektorstatus für Plasmodien**	**Brutgewässer**
An. gambiae s.str.	ganz Afrika südl. der Sahara	anthropophag	+++	Süßwasser
An. arabiensis	ganz Afrika südl. der Sahara	anthropophag	+++	Süßwasser
An. quadriannulatus	Sansibar, Äthiopien, Südostafrika	zoophag	-	Süßwasser
An. bwambae	Semliki Valley (Uganda)	anthropophag	++	mineralhaltige Quellen
An. melas	westafr. Küste	zoophag+anthropophag	+	Salz-Brackwasser
An. merus	ostafr. Küste	zoophag+anthropophag	+	Salz-Brackwasser

mit Ausnahme der unmittelbaren Pazifikküste fast das komplette westliche Nordamerika (AITKEN 1945); *An. occidentalis* dagegen ist nur in Küstengebieten der nordamerikanischen Westküste von der Mitte der Vereinigten Staaten bis hinauf nach Alaska nachzuweisen. *An. aztecus* kommt im Hochland Zentralmexikos vor, und *An. hermsi*, der erst 1987 als eigene Spezies erkannt wurde (BARR & GUPTAVANIJ 1988), ist bis jetzt nur für Kalifornien beschrieben worden (COPE et al. 1988). Als Überträger der Malaria gelten *An. freeborni* und *An. hermsi*. Beide Arten sind zoo- und anthropophag, endo- und exophag sowie endo- und exophil (SERVICE 2000).

Aufgrund kleiner, aber konsistenter morphologischer Unterschiede zwischen den nearktischen *maculipennis*-Arten (PRATT 1952; Ausnahme: *An. freeborni* und *An. hermsi*, vgl. FRITZ et al. 1991), ist davon auszugehen, dass die Evolution im nordamerikanischen Raum entweder schon für einen längeren Zeitraum oder aber schneller auf die Mücken gewirkt hat als in der paläarktischen Region. Hierfür spricht auch, dass sich die Verbreitungsgebiete der einzelnen nearktischen Arten kaum überschneiden (KITZMILLER et al. 1967).

1.2 Der *Anopheles gambiae*-Komplex

Erst Ende der 1950er Jahre wurde offenbar, dass sich auch hinter dem Taxon *Anopheles gambiae* mehrere isomorphe Spezies versteckten (WHITE 1974; SERVICE 1985). Nach heutigem Kenntnisstand umfasst der *An. gambiae*-Komplex mindestens sechs Zwillingsarten.

An. gambiae s.str. GILES 1922 (ehemals Spezies A)
An. arabiensis PATTON 1905 (ehemals Spezies B)
An. quadriannulatus THEOBALD 1911 (ehemals Spezies C)
An. bwambae WHITE 1985 (ehemals Spezies D)
An. merus DÖNITZ 1902
An. melas THEOBALD 1903

Bei *An. gambiae* s.str. (Abb. 1) und *An. arabiensis* handelt es sich – neben *An. funestus* – um die wichtigsten Malariaüberträger Afrikas (SERVICE 1985). Sie gehören zu den ‚Süßwasserarten' des Komplexes, weil ihre Larvalentwicklung in Süßwasser stattfindet. Beide Arten kommen weitgehend sympatrisch auf dem ganzen afrikanischen Kontinent südlich der Sahara vor, wobei *An. gambiae* s.str. in feuchten Gebieten prädominiert, während *An. arabiensis* in ariden Zonen relativ häufiger anzutreffen ist (WHITE 1974; GILLIES & COETZEE 1987). Beide Arten sind grundsätzlich stark anthropophil und endophil, bieten sich aber andere Säuger als Blutwirte an, so äußert *An. arabiensis* eine verhältnismäßig stärkere Tendenz, an Tieren Blut aufzunehmen als *An. gambiae* s.str. Da sich solche Tiere meist außerhalb menschlicher Behausungen aufhalten, zeigt *An. arabiensis* auch ein größeres Maß an Exophagie (WHITE 1974).

An. quadriannulatus brütet ebenfalls in Süßwasser und ist in seiner geographischen Verbreitung auf wenige separate Regionen Afrikas beschränkt, die vorwiegend um die Hochland-Plateaus des Nordens und des Südens zu finden sind und ein gemäßigteres Klima aufweisen: Sansibar, Äthiopien und das großräumige Südafrika (WHITE 1974). *An. quadriannulatus* gilt als nahezu rein zoophag und spielt daher aus humanmedizinischer Sicht eine zu vernachlässigende Rolle (WHITE 1974; GILLIES & COETZEE 1987).

An. bwambae wurde erst 1972 als selbständige Spezies erkannt (DAVIDSON & WHITE 1972; WHITE 1973). Sein Vorkommen ist nur für das Semliki Valley im Bwamba Distrikt, Uganda, beschrieben, wo er in sehr mineralhaltigen Gewässern brütet, die von Thermalquellen gespeist werden (WHITE 1985). *An. bwambae* kann als anthropophil mit endophagen und endophilen Tendenzen betrachtet werden und ist lokal im Semliki Forest der Hauptmalariavektor (WHITE 1973, 1974).

Die beiden ‚Salz-, oder ‚Brackwasserarten' *An. merus* und *An. melas* kommen ausschließlich in den Küstenregionen Ost- bzw. Westafrikas vor. Sie scheinen sich im Laufe der Evolution unabhängig voneinander entwickelt, aber vergleichbare ökologische Nischen besetzt zu haben (GILLIES & DE MEILLON 1968). Beide kommen als Überträger der Malaria und anderer Krankheiten in Frage, insbesondere dann, wenn neben dem Menschen keine alternativen Blutwirte vorhanden sind.

Erst vor wenigen Jahren wurde in Äthiopien möglicherweise eine weitere zum *An. gambiae*-Komplex gehörende Art (*An. quadriannulatus* Spezies B) identifiziert (HUNT et al. 1998).

2 Kreuzungsexperimente

Kreuzungs- oder Hybridisierungsexperimente stellen die älteste Methode zur Verwandtschaftsanalyse von biologischen Spezies dar. So lieferten Kreuzungsexperimente der verschiedenen ‚Rassen' von *An. maculipennis* schon früh erste Belege dafür, dass es sich bei den unterschiedlich gearteten Populationen um echte Spezies handelte (DE

Artenkomplex	Anzahl Zwillingsarten	zoogeographische Region
An. gambiae s.l.	6 +	afrotropisch
An. maculipennis s.l.	9 5	paläarktisch nearktisch
An. albitarsis s.l.	4	neotropisch/nearktisch
An. nuneztovari s.l.	3	neotropisch
An. culicifacies s.l.	5	orientalisch
An. dirus s.l.	7	orientalisch
An. fluviatilis s.l.	4	orientalisch
An. minimus s.l.	4	orientalisch
An. sinensis s.l.	2	orientalisch
An. subpictus s.l.	4	orientalisch
An. punctulatus s.l.	11	australasisch

Tab. 2: Wichtige Artenkomplexe innerhalb der Gattung *Anopheles*.



Abb. 1: Weibchen von *An. gambiae* s.str. bei der Blutaufnahme (Foto: Prof. Dr. H.M. Seitz)

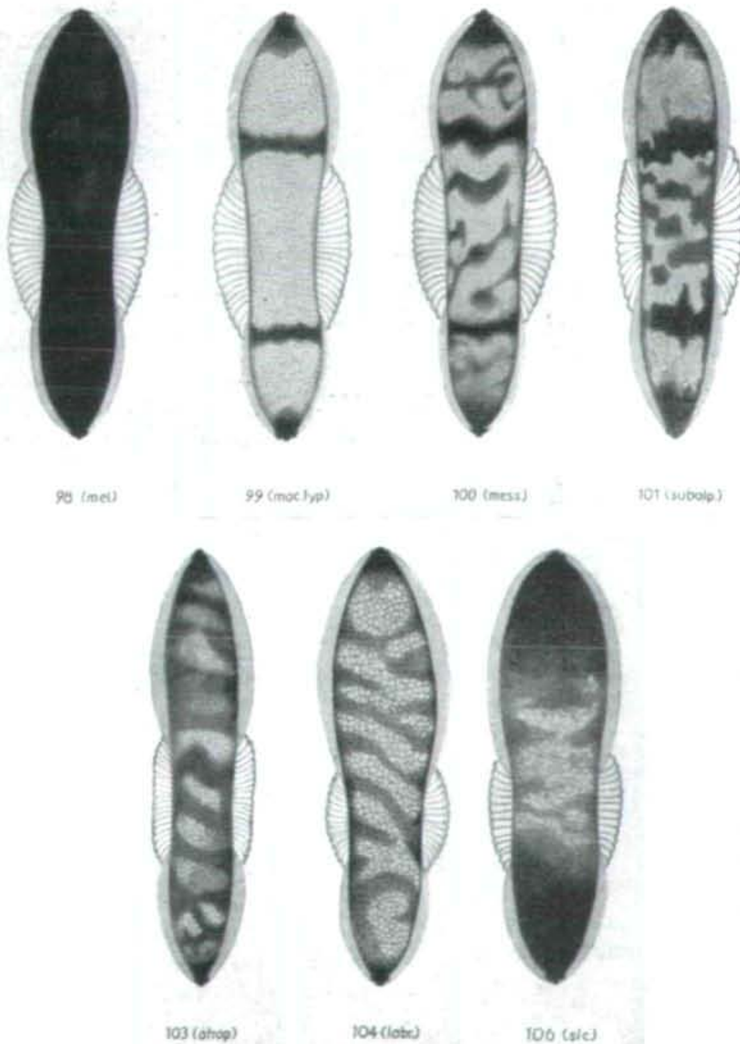


Abb. 2: Eitypen mehrerer *An. maculipennis*-Zwillingsarten (aus: PEUS 1942)

BUCK et al. 1934; CORRADETTI 1937; BARR 1954). Auch innerhalb des *An. gambiae*-Komplexes haben Kreuzungsexperimente zur Entdeckung einiger Arten geführt (DAVIDSON & JACKSON 1962; DAVIDSON et al. 1964a).

Bei der Kreuzung von Zwillingsarten werden unterschiedliche Grade an Kompatibilität erreicht, die sich im Stadium des Entwicklungsabbruchs voneinander unterscheiden und als Maß für den Verwandtschaftsgrad betrachtet werden können: am einen Ende der Kreuzungsreihe stehen Eier, die trotz Insemination des Weibchens durch ein Männchen nicht befruchtet werden, am anderen Ende geschlüpfte Imagines, die aber meist steril sind. Das erste Kreuzungspaar ist nur entfernt, das zweite sehr eng miteinander verwandt. Sollte die Entwicklung im Falle einer Befruchtung der Eier bis zum Schlupf der Imagines fortschreiten, so ist das Geschlechterverhältnis in der F1-Generation häufig stark verschoben, meist zu Gunsten der Männchen. Sterilität bei hybriden Männchen tritt weitaus häufiger auf als bei hybriden Weibchen (DAVIDSON 1964b, GILLIES & DE MEILLON 1968; WHITE 1971; Ausnahmen s. DAVIDSON & WHITE 1972; DAVIDSON 1974; KITZMILLER et al. 1967).

Während es im Labor auch zwischen Männchen und Weibchen verschiedener Zwillingsarten gelegentlich zu freiwilliger Kopulation kommt (OKEREKE 1980), ist dies in der Natur vermutlich nur sehr selten der Fall (z. B. WHITE 1971; MAHON et al. 1976; BRYAN 1979). Mit Hilfe der induzierten Kopulation (‚forced mating') kann eine Besamung aber auch bei Arten oder Individuen herbeigeführt werden, die sich nicht freiwillig paaren (BAKER et al. 1962). Hierbei werden die Genitalien eines anästhesierten Weibchens einem unmittelbar zuvor dekapitierten Männchen präsentiert, wodurch bei letzterem Kopulation und Befruchtung reflexartig ausgelöst werden.

3 Morphologie

Aus naheliegenden Gründen wurden auch bei Zwillingsarten immer wieder Versuche unternommen, morphologische Kriterien zur Artdiagnostik zu finden (WHITE 1977). Körpergröße, Färbung, Anordnung von Schuppen, Ausbildung des Exochorions, Länge, Verteilung und Aussehen bestimmter Setae und Palmhaare, Maxillarindex, Größe der Spermatheken u. v. m. wurden auf ihre Eignung als Unterscheidungsmerkmale von Imagines, Puppen und Larven untersucht (z. B. BATES 1939a; RIBBANDS 1944; LAVEN 1950/51; COLUZZI 1964; ISMAIL & HAMMOUD 1968; ZAHAR et al. 1970; WHITE & MUNISS 1972; REID 1975; KORVENKONTIO et al. 1979; COETZEE 1986; DERUAZ et al. 1991). Während die Variabilität morphologischer Strukturen zwischen Zwillingsarten aber per definitionem minimal ist, können intraspezifische Abweichungen zuweilen vergleichsweise groß sein (GILLIES & DE MEILLON 1968). So können Eigenschaften nicht nur geographisch (REID

1973) und saisonal (temperaturabhängig) variieren (LE SUEUR & SHARP 1991), sondern auch zwischen Laborkolonien und natürlichen Populationen unterschiedlich sein (CHAUVET et al. 1969; WHITE & MUNISS 1972).

Nichtsdestoweniger hat sich die Bestimmung der Färbung und Struktur der Eihülle zur Artidentifizierung innerhalb des paläarktischen *An. maculipennis*-Komplexes (Abb. 2) jahrzehntelang als die Methode der Wahl erwiesen (HACKETT et al. 1932; BATES & HACKETT 1938; MOHRIG 1969). Ebenfalls an ihren Eiern, aber nur unter Zuhilfenahme eines Elektronenmikroskopes, können *An. quadrimaculatus*-Arten mit relativ hoher Sicherheit identifiziert werden (LINLEY et al. 1993). Die Anzahl der Äste bestimmter Palmhaare von Larven und Puppen der beiden Zwilllingsarten des *An. claviger*-Komplexes (SCHAFFNER et al. 2001), *An. claviger* s.str. und *An. petragnani*, scheinen sogar ein absolut sicheres Unterscheidungsmerkmal zu sein, wie molekularbiologische Vergleichsuntersuchungen zeigten (KAMPEN et al. 2003).

4 Salinitätstoleranz

Zur Unterscheidung von Süß- und Salzwasserarten innerhalb des *An. gambiae*-Komplexes bediente man sich – in Anlehnung an Untersuchungen von MUIRHEAD-THOMSON (1951) – gelegentlich des Salinitätstoleranztests: L1-Larven wurden für zwei Stunden in Salzwasser eingesetzt, das in seinem Salzgehalt etwa 75 % desjenigen von reinem Meerwasser entsprach (23,8 g NaCl/l; nach DAVIDSON et al. 1967). Ein Großteil der Larven der Süßwasserarten *An. gambiae* s.str., *An. arabiensis* und *An. quadriannulatus* werden durch diese Behandlung getötet, während keine oder nur geringe Mortalität bei den Salzwasserarten *An. merus* und *An. melas* festzustellen ist (DAVIDSON et al. 1967). Umgekehrt ist dieser Versuch nicht aussagekräftig, da die sogenannten Salzwasserarten euryhaline Organismen sind und hohe Salzkonzentrationen zwar tolerieren können, aber für ihre Entwicklung nicht auf diese angewiesen sind (COLUZZI 1970). So kann *An. merus* im Labor mühelos in Süßwasser gehalten werden (MOSHA & MUTERO 1982). In Südafrika wurden *An. merus*-Larven aber auch im Freiland in eindeutig nicht-salzhaltigen Gewässern nachgewiesen (COETZEE et al. 1993).

Obwohl diese Art der Differenzierung keine Rolle beim *An. maculipennis*-Komplex spielte, so haben doch auch dessen Zwillingsarten eigene, charakteristische Salinitätspräferenzen, die für öko-epidemiologische Betrachtungen durchaus relevant sein können (BATES 1939b).

5 Zytotaxonomie

Die Zytogenetik war jahrzehntelang die Standardmethode für systematische Studien bei Dipteren und spielte eine außerordentlich wichtige Rolle bei der Neubeschreibung von Zwillingsarten sowie der Artidentifizierung innerhalb von *Anopheles*-Artenkomplexen (KITZMILLER 1967; COLUZZI 1988). Die Zytotaxonomie macht sich die Bandenmuster polytäner Riesenchromosomen, die mit Orcein angefärbt werden (FRENCH et al. 1962, HUNT 1973), und in ihnen vorkommender Inversionspolymorphismen und anderer genetischer Rearrangements zunutze (Abb. 3). Am besten geeignet für die Herstellung zytogenetischer Präparate von Culiciden sind die Speicheldrüsenzellen von L4-Larven (COLUZZI & SABATINI 1967) oder die Nährzellen der Ovariolen halbgravider Weibchen (Christophers Stadium III) (COLUZZI 1968). Die Methode ist höchst zuverlässig und erlaubt aufgrund intraspezifischer Inversionen in den Chromosomen außerdem eine Differenzierung unterhalb der Artgrenze (COLUZZI et al. 1985; COSTANTINI et al. 1999). Hieraus können Rückschlüsse über 'werdende Arten' gezogen werden (*An. gambiae* s.str. in Mali: Savannen- und Waldform, darunter Bissau-, Mopti- und Bamako-Form; TOURÉ 1989). Von epidemiologischer Bedeutung ist die Möglichkeit, Verhaltensweisen mit Inversionskaryotypen bei Mischpopulationen von *An. gambiae* s.l. korrelieren zu können (COLUZZI et al. 1977, 1979; BRYAN et al. 1982).

Ein großer Vorteil der Zytotaxonomie sind der einfache Ausstattungsbedarf und die vergleichsweise niedrigen Kosten. Die Methode ist daher prädestiniert für den Einsatz im Feld und in Laboratorien wirtschaftlich unterentwickelter Länder. Nachteilig ist die Tatsache, dass man auf die beiden genannten Entwicklungsstadien angewiesen ist, was häufig dazu führt, dass man im Feld gefangene nüchterne Mückenweibchen im Labor mit Blut füttern muss, um das richtige Entwicklungsstadium der Ovarien zu erhalten. Bei bereits graviden Weibchen dagegen muss die Eiablage abgewartet werden, so dass die Nachkommenschaft oder das Muttertier nach erneuter Blutmahlzeit untersucht werden kann.

Während die Zytotaxonomie auch bei der Erforschung der nearktischen (KITZMILLER et al. 1967) sowie der in Osteuropa und Asien vorkommenden Populationen der paläarktischen Arten (v. A. von *An. messeae*) des *An. maculipennis*-Komplexes (STEGNII 1987) intensiv eingesetzt wurde, wurde sie bei den west- und zentraleuropäischen Populationen nach anfänglichen Pionierarbeiten (z. B. FRIZZI 1947, 1949, 1953) wieder weitgehend vernachlässigt. Dies hängt vermutlich mit einem allgemeinen Nachlassen des Interesses an europäischen Stechmücken zusammen, die mit der Ausrottung der Malaria nach der Mitte des letzten Jahrhunderts offenbar keine Rolle als Krankheitsüberträger mehr spielten.

Zwillingsarten, die allein auf der Basis polytäner Chromosomen beschrieben wurden, nennt man ‚Zytospezies' (CROSSKEY 1988): Neben *An. beklemishevi* als Vertreter der Gattung *Anopheles* (STEGNII & KABANOVA 1978) können als solche z. B. auch sechs Zwillingsarten des *Simulium damnosum*-Komplexes in Westafrika (VAJIME & DUNBAR 1975) angeführt werden.

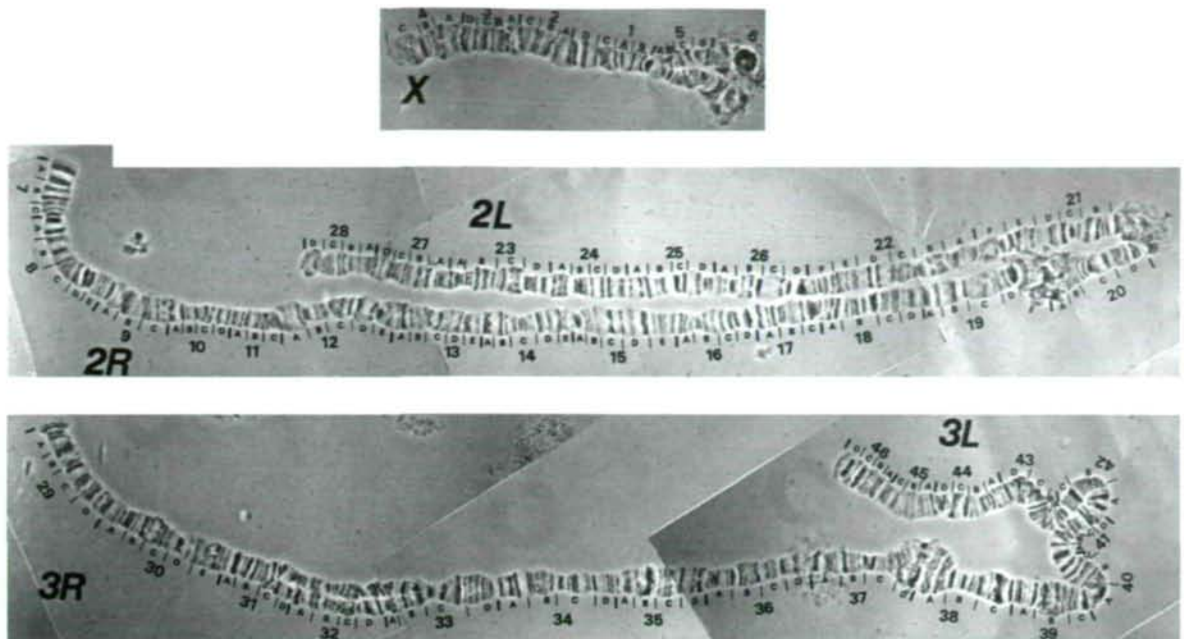


Abb. 3: polytäne Riesenchromosomen von *An. gambiae* s.str. (Quelle: AnoBase, http://skonops.imbb.forth.gr/AnoBase/)

6 Zymotaxonomie

AYALA & POWELL (1972) schlugen erstmals vor, dass Allozyme (Enzyme, die von verschiedenen Allelen desselben Genlocus kodiert werden) möglicherweise geeignet wären, Zwillingsarten voneinander zu differenzieren. Tatsächlich gelang es ihnen, diagnostische Allozyme für die Identifizierung von Mitgliedern der *Drosophila willistoni*-Artengruppe zu demonstrieren.

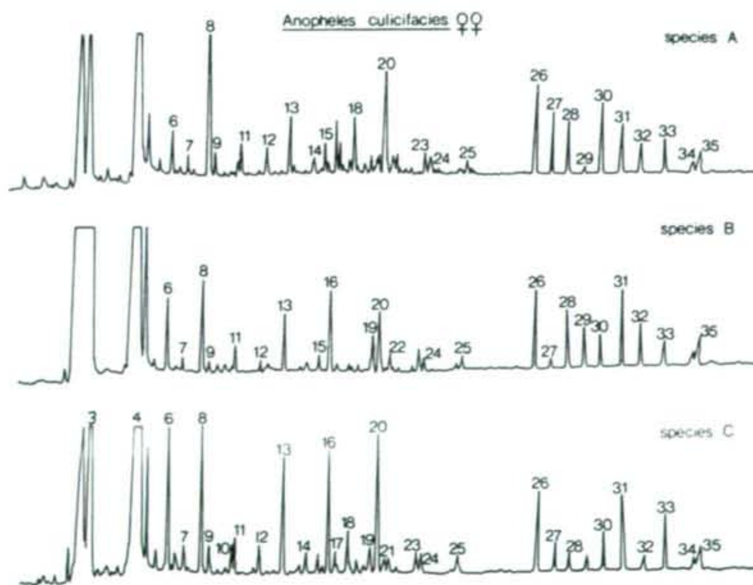


Abb. 4: Gaschromatogramme von drei Zwillingsarten des *An. culicifacies*-Komplexes (aus: MILLIGAN et al. 1986)

Die Enzymelektrophorese entwickelte sich schnell zu einer wichtigen, häufig parallel zur Zytotaxonomie benutzten Methode zur Artidentifizierung in Artenkomplexen (z. B. BULLINI 1984; COLUZZI 1988). Diese Technik macht sich die unterschiedlichen Wanderungsgeschwindigkeiten der Enzymproteine in einem elektrischen Feld zunutze, die aus deren elektrischer Ladung und Molekülstruktur resultieren. Hierbei werden Totalhomogenate einzelner Mücken gelelektrophoretisch aufgetrennt, wobei als Trägermedium Stärke, Zelluloseacetat oder Polyacrylamid verwendet wird (z. B. STEINER & JOSLYN 1979; COETZEE et al. 1993). Die Endposition ausgewählter Enzyme im Gel kann durch Behandlung des Gels mit dem spezifischen löslichen Substrat, das in Verbindung mit einer Farbreaktion umgesetzt wird und präzipitiert, sichtbar gemacht werden (MAHON et al. 1976; HARRIS & HOPKINSON 1977; STEINER & JOSLYN 1979; RICHARDSON et al. 1986).

Bei der Zymotaxonomie werden variable, aber korrespondierende Genloci vergleichend analysiert. Nach der Substratfärbung entsteht ein Allozym-spezifisches Laufmuster (Zymogramm). Da die Allele eines Genlocus in der Regel kodominant sind, können homo- und heterozygote Individuen leicht erkannt werden. In der Praxis setzt sich ein Zymogramm häufig aus den Produkten zweier oder mehrerer Genloci zusammen, die für Enzyme mit ähnlichen katalytischen Eigenschaften (Isoenzyme) kodieren. Die Laufgeschwindigkeit der Allozyme wird angegeben, indem das in den natürlichen Populationen häufigste und am weitesten verbreitete die Zahl ‚100' erhält. Die Mobilitäten der anderen Allele (Elektromorphe) werden relativ zu diesem bestimmt.

Aufgrund geographischer Polymorphismen in den natürlichen Mückenpopulationen auch innerhalb einer

Art (GILLIES & COETZEE 1987) kann die Zymotaxonomie nur nach vorheriger Evaluierung der regionalen Elektromorph-Varianten angewendet werden (MARCHAND & MNZAVA 1985; HUNT & COETZEE 1986a, b; MNZAVA & KILAMA 1986). Geeignete Genloci müssen daher über die Bestimmung von Allelfrequenzen im Rahmen populationsgenetischer Studien ermittelt werden. Auf der Basis der Allelfrequenzen können nun biochemische Schlüssel zur Identifizierung der fraglichen Zwillingsarten erstellt werden. Die resultierenden spezifischen Zymogramme können im Idealfall einer einzelnen Moskitoart zugeordnet werden. Entsprechende Schlüssel sind z. B. für den *An. gambiae*-Komplex (MILES 1979), für den *An. maculipennis*- und den *An. claviger*-Komplex (Tab. 3; BULLINI 1984) sowie für den *An. punctulatus*-Komplex (FOLEY & BRYAN 1993) entwickelt worden.

Beispiele für häufig verwendete Enzyme sind Superoxiddismutase, Malatdehydrogenase, Phosphoglucomutase und verschiedene unspezifische Esterasen.

Ein Nachteil der Zymotaxonomie besteht in der postmortalen Behandlung des Untersuchungsmaterials: Um den Proteinabbau zu verhindern, müssen die Mücken entweder unmittelbar nach dem Abtöten aufgearbeitet oder in Flüssigstickstoff überführt werden (HUNT & COETZEE 1986b), was insbesondere bei Feldstudien in Afrika problematisch ist.

Während unter den blutsaugenden Insekten bislang allein aufgrund chemotaxonomischer Kriterien keine Zwillingsart (‚Zymospezies', CROSSKEY 1988) neu beschrieben wurde, war dies z. B. in der *Drosophila willistoni*-Gruppe durchaus der Fall (AYALA 1973). Zur Erstbeschreibung von *An. bwambae* aus dem *An. gambiae*-Komplex wurden immerhin enzymatische Eigenschaften ko-diagniostisch mit Chromosomenmustern herangezogen (WHITE 1985).

7 Chromatographie kutikulärer Kohlenwasserstoffe

Die Kutikula des Insektenkörpers enthält in ihrem äußeren Bereich eine dünne Wachsschicht, die die Flüssigkeitsabgabe über die Körperoberfläche reduziert und so das Insekt vor Austrocknung schützt. Wesentliche Bestandteile (bis zu 75 %) der kutikulären Lipide sind aliphatische Kohlenwasserstoffe unterschiedlicher chemischer Struktur (LOCKEY 1980). Es wird angenommen, dass sich die Zusammensetzung der kutikulären Kohlenwasserstoffe, die auch der chemischen Kommunikation dienen (z. B. als Attraktanzien zur Geschlechterfindung), schnell im Laufe der Evolution ändert, um eine reproduktive Isolierung zu gewährleisten (ANYANWU et al. 1993).

Mit Hilfe der Gaschromatographie (GC) lassen sich aus der Kutikula extrahierte Kohlenwasserstoffe auftrennen und zur Artbestimmung bei medizinisch wichtigen Arthropoden nutzen (PHILLIPS et al. 1986, 1988). Bei dieser Methode werden die kutikulären Lipide mit einem organischen Lösungsmittel (z. B. Hexan) aus der Wachsschicht des Exoskeletts gelöst. Das Extrakt wird auf eine Kapillarsäule gegeben und gaschromatographisch aufgetrennt. Als Resultat entsteht ein Computer-generiertes Profil, in dem jede Kohlenwasserstoffverbindung als Kurvenausschlag erscheint (Abb. 4). Die Lokalisation eines Maximums auf der Zeitachse des Chromatogramms dient der Identifizierung der Substanz, und die Fläche unter jedem Ausschlag ist proportional zu seiner Konzentration (PHILLIPS et al. 1988).

Genlocus	Elektromorphe		Spezies
(1) Mdh-1	103/103	-	*An. claviger*
	98/98	-	*An. petragnani*
	andere Genotypen	-	(2)
(2) Me	96/96	-	*An. messeae*
	104/104	-	*An. atroparvus*
	andere Genotypen	-	(3)
(3) Hbdh	92/100, 92/108, 100/100, 100/108, 108/108	-	*An. maculipennis s.str.*
	92/92, 92/102	-	(4)
	andere Genotypen	-	(5)
(4) Hk-1	90/90, 90/100, 100/100	-	*An. melanoon*
	95/95, 95/97, 97/97	-	*An. sacharovi*
(5) Odh	100/100, 100/106	-	*An. labranchiae*
	95/106, 106/106, 106/109, 109/109	-	*An. subalpinus*

Tab. 3: Allozym-Bestimmungsschlüssel für die in Italien vorkommenden Zwillingsarten des *An. maculipennis*- und des *An. claviger*-Komplexes (Mdh-1: Malatdehydrogenase 1; Me: Maleinsäure-Enzym; Hbdh: Hydroxybutyrat-dehydrogenase; Hk-1: Hexokinase 1; Odh: Octanoldehydrogenase)

Die gaschromatographische Kohlenwasserstoff-Analyse wurde vorwiegend zur Identifizierung von Simuliiden (CARLSON & WALSH 1981; PHILLIPS et al. 1985; MILLEST 1992), Phlebotomen (RYAN et al. 1986; KAMHAWI et al. 1987; PHILLIPS et al. 1987, 1990a) und Anophelen (ANYANWU et al. 1993) entwickelt. Gegenstand der Untersuchungen in der Gattung *Anopheles* war i. W. die Differenzierung von Zwillingsarten des *An. gambiae*- (CARLSON & SERVICE 1979; HAMILTON & SERVICE 1983), des *An. culicifacies*- (MILLIGAN et al. 1986), des *An. maculipennis*- (PHILLIPS et al. 1990b) sowie des *An. maculatus*-Komplexes (KITTAYAPONG et al. 1990).

Die GC-Analysen der kutikulären Kohlenwasserstoffe beschränkten sich weitgehend auf genetisch definiertes Labormaterial; im Rahmen umfangreicherer epidemiologischer Studien kam die Methode kaum zum Einsatz. Ergebnisse und Erfahrungen aus Identifizierungsversuchen mit Wildfängen unterschiedlicher geographischer Herkunft wären aber erforderlich gewesen, um diese technisch aufwendige Methode konkurrenzfähig zu machen. Bei ihrer Evaluierung zeigte sich z. B., dass ihre Spezifität – je nach Untersuchungskollektiv und statistischer Auswertung – nahe an 100 % herangehen (z. B. RYAN et al. 1986), aber auch weniger als 80 % erreichen kann (z. B. PHILLIPS et al. 1988). Zu berück-

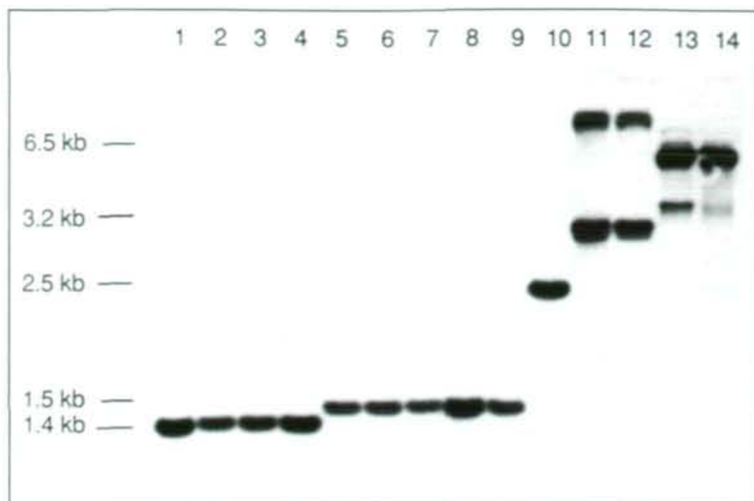


Abb. 5: Autoradiogramm von fünf Zwillingsarten des *An. gambiae*-Komplexes nach Restriktion mit der Endonuklease *Hin*dIII und Southern Blot-Hybridisierung mit der DNA-Sonde pAGr12B (aus: COLLINS et al. 1988a) (Spuren 1–4: *An. arabiensis*; 5–9: *An. gambiae* s.str.; 10: *An. quadriannulatus*; 11, 12: *An. merus*; 13, 14: *An. melas*)

sichtigen ist, dass Faktoren, wie Alter, Geschlecht, Ernährungs- und Entwicklungszustand, auch intraspezifisch zu Variationen führen können (JACKSON & BLOMQUIST 1976; PHILLIPS et al. 1988).

8 Weitere Differenzierungsansätze

Weil die etablierten Methoden zur Identifizierung von *Anopheles*-Zwillingsarten nicht ohne Nachteile waren, gab es vor dem Beginn des molekularbiologischen Zeitalters immer wieder Ansätze zur Entwicklung neuer biochemischer und zytogenetischer Differenzierungstechniken, insbesondere für den *An. gambiae*-Komplex. Einige wurden wegen beschränkter Einsetzbarkeit nicht weiter verfolgt.

8.1 Antikörpertest

Eine solcher Studien beschäftigte sich mit der Differenzierung von *An. gambiae* s.str. und *An. arabiensis* mit Hilfe von Antikörpern. MA et al. (1990) konnten einen polyklonalen Antikörper, der gegen lösliches *An. gambiae* s.str.-Dotterprotein gerichtet war, mittels Immunoaffinitäts-Chromatographie soweit reinigen, dass keine Kreuzreaktionen mehr mit *An. arabiensis*-Antigen auftraten. Der aufgereinigte Antikörper wurde im ELISA (enzyme-linked immunosorbent assay) gegen *An. gambiae* s.str.-Vitellogenin eingesetzt. Der Test kann ausschließlich mit halbgraviden Weibchen durchgeführt werden.

8.2 Lektin-Bindungseigenschaften

Durch Versuche an *Aedes aegypti* (PERRONE et al. 1986) und Tsetsefliegen (OKOLO et al. 1988) aufmerksam geworden, testeten MOLYNEUX et al. (1990) Variationen in den Bindungseigenschaften verschiedener FITC (Fluoresceinisothiocyanat)-konjugierter Lektine an Kohlenhydrate der Speicheldrüsenoberflächen von *An. gambiae* s.str.- und *An. arabiensis*-Weibchen. Die Lektine banden zwar tatsächlich in unterschiedlichen Mustern an die drei Speicheldrüsenlappen der beiden *An. gambiae*-Zwillingsarten, doch kam es gleichzeitig auch zu Unterschieden zwischen artgleichen Mückenstämmen verschiedener geographischer Herkunft. Vor einem Routineeinsatz dieser Methode hätten die Bindungscharakteristika also für jede Population differenziell eruiert werden müssen.

8.3 Fluoreszenzfärbung von Metaphase-Chromosomen

GATTI et al. (1977) führten lichtmikroskopische Untersuchungen an mitotischen Chromosomen von *An. gambiae* s.str. und *An. arabiensis* durch, die mit dem Benzimidazolderivat Hoechst 33258 gefärbt worden waren. Dieser Fluoreszenzfarbstoff färbt AT-reiche DNA (WEISBLUM & HAENSSLER 1974). Zuvor waren bei zwei *Drosophila*-Zwillingsarten Variationen in den chromosomalen Färbungseigenschaften aufgefallen (ELLISON & BARR 1971). Nachdem auch GATTI und Kollegen speziesspezifische Unterschiede in der Lokalisation und Helligkeit einiger heterochromatischer Blöcke auf den Geschlechtschromosomen in der Metaphase nachweisen konnten, äußerten sie die Hoffnung, dass entsprechende Merkmale die herkömmliche Zytotaxonomie ergänzen könnten, da alle Larvenstadien und auch Puppen für die Untersuchung geeignet wären.

Auf ähnliche Weise, aber nach Anfärbung der Chromosomen mit dem Farbstoff Quinacrine (COMINGS et al. 1973), konnten MEZZANOTTE & FERRUCCI (1978) *An. atroparvus* und *An. labranchiae* aus dem *An. maculipennis*-Komplex differenzieren. In Ermangelung von Polymorphismen mit anderen Techniken war diese Art der Karyotyp-Analyse beim südostasiatischen *An. balabacensis*-Komplex (BAIMAI et al. 1981; WIBOWO et al. 1984) vor der Verfügbarkeit geeigneter molekularbiologischer Techniken sogar die einzige Methode der Artidentifizierung.

9 DNA-Hybridisierung

Nachdem DNA-Sonden schon geraume Zeit in der Forschung und der Diagnostik eingesetzt worden waren, um virale, bakterielle und parasitäre Pathogene im Menschen oder im Überträger nachzuweisen (z. B. BORNKAMM et al. 1983; BARKER 1990; ENGLEBERG & EISENSTEIN 1992), wurden sie Ende der 1980er Jahre auch zur Differenzierung von Vektoren vieler Krankheitserreger von ihren vektorinkompetenten Zwillingsarten eingesetzt (z. B. POST 1985; CRAMPTON et al. 1987; POST & CRAMPTON 1988; COCKBURN 1990; ADAMSON et al. 1991; BOOTH et al. 1991; COOPER et al. 1991; READY et al. 1991; HARTAS et al. 1992; BEEBE et al. 1994). Von vielen möglichen Ansätzen sollen hier beispielhaft zwei richtungsweisende Varianten zur Identifizierung der

Zwillingsarten des *An. gambiae*-Komplexes vorgestellt werden, von denen die eine vor der Sonden-Hybridisierung eine Aufbereitung der DNA erfordert.

9.1 RFLP-Methode/Southern Blot-Hybridisierung

Am CDC in Atlanta, USA, entwickelte die Arbeitsgruppe um COLLINS in den 1980er Jahren DNA-Sonden, die spezies-spezifische Polymorphismen in der Länge von Restriktionsfragmenten (RFLPs = restriction fragment length polymorphisms) in der ribosomalen DNA der *An. gambiae*-Zwillingsarten aufdecken (Abb. 5; COLLINS et al. 1987, 1988a). Die Sonden sind hochspezifisch und sowohl der klassischen Zytotaxonomie als auch der Isoenzymelektrophorese bezüglich der Spezifität mindestens ebenbürtig (COLLINS et al. 1988b, c). Die Hybridisierungstechnik kann auf alle Entwicklungsstadien angewendet werden und erfordert keine besondere Fixierungsmethode. Für die Untersuchung größerer Mengen von Moskitos oder die Anwendung im Feld ist sie jedoch nur begrenzt brauchbar: die DNA jeder einzelnen Mücke muss isoliert, mit einer Restriktionsendonuklease geschnitten, gelelektrophoretisch aufgearbeitet, per Southern-Blot auf eine Filtermembran übertragen und mit der entsprechenden Sonde hybridisiert werden.

9.2 Squash Blot-/Dot Blot-Hybridisierung

CRAMPTON und Mitarbeiter (Liverpool School of Tropical Medicine, England) erarbeiteten etwa zur selben Zeit ein System aus mehreren DNA-Sonden, die in Verbindung mit der schnellen Squash Blot-Technik (TCHEN et al. 1985) zum Einsatz kommen sollte. Hierbei wird das Mückengewebe direkt auf dem Hybridisierungsfilter zerquetscht und fixiert (GALE & CRAMPTON 1987a, b; 1988; HILL et al. 1991a, b, 1992). Die Sonden dieses Systems sind jedoch nicht so spezifisch, dass sie nur mit einer der Zwillingsarten reagieren. Die verschiedenen Arten besitzen allerdings eine unterschiedliche 'copy number' der Zielsequenz im Genom, was in Intensitätsunterschieden der Detektionssignale zum Ausdruck kommt. Um eine Mücke bestimmen zu können, benötigt man immer das Ergebnis aus Hybridisierungsversuchen mit drei verschiedenen Sonden, so dass das Filter mehrfach sauber gewaschen und rehybridisiert werden muss.

Ein weiterer Nachteil dieses Systems war zunächst die Tatsache, dass die *An. arabiensis*-spezifische Sonde geschlechtsspezifisch für Männchen war. Weibchen konnten nur dann identifiziert werden, wenn sie befruchtet waren und Spermien im Receptaculum seminis trugen (GALE & CRAMPTON 1988). Erst später kam es zur Entwicklung einer weiteren DNA-Sonde, die auch zwischen weiblicher DNA von *An. gambiae* s.str. und *An. arabiensis* unterscheiden konnte (HILL & CRAMPTON 1994a).

In Asien wurde eine Dot Blot-Variante zur Differenzierung der Zwillingsarten des *An. dirus*-Komplexes entwickelt, bei der nicht die Mücken direkt, sondern zuvor homogenisiertes Gewebe zwecks Hybridisierung mit spezies-spezifischen Sonden auf ein Filter aufgetragen wird (Abb. 6; PANYIM et al. 1988; AUDTHO et al. 1995).

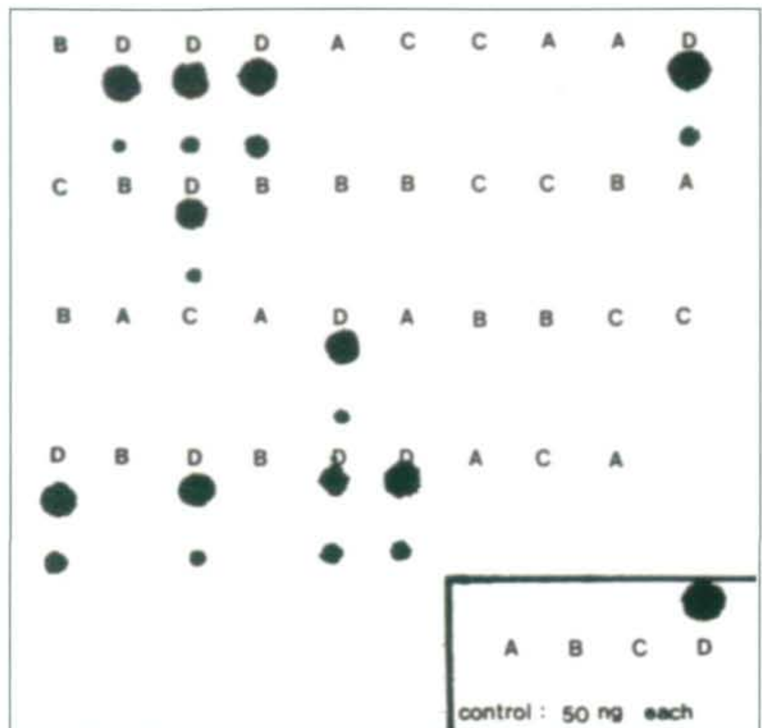


Abb. 6: Autoradiogramm von vier Zwillingsarten des *An. dirus*-Komplexes nach Dot Blot-Hybridisierung mit der Spezies D-spezifischen DNA-Sonde pMU-D76 (aus: PANYIM et al. 1988) (obere Reihe: 1/60, untere Reihe: 1/150 der Mücken-DNA)

10 Polymerase-Kettenreaktion

Vor einem guten Jahrzehnt wurde die Polymerase-Kettenreaktion (PCR) in systematischen Studien eingeführt und wird seitdem auch zur Identifizierung von Zwillingsarten verwendet. Insbesondere Artenkomplexe werden molekularbiologisch aufgearbeitet, hierunter zahlreiche innerhalb der Gattung *Anopheles*: die afrikanischen *An. gambiae*- (Abb. 7; SCOTT et al. 1993; TOWNSON & ONAPA 1994) und *An. funestus*-Komplexe (KOEKEMOER et al. 2002), die nordamerikanischen *An. quadrimaculatus*- (CORNEL et al. 1996) und *An. maculipennis*-Komplexe (PORTER & COLLINS 1991), die asiatischen *An. dirus*- und *An. fluviatilis*-Komplexe (WALTON et al. 1999; MANONMANI et al. 2001), der südwestpazifische *An. punctulatus*-Komplex (BEEBE & SAUL 1995) sowie die europäischen *An. maculipennis*- (Abb. 8; PROFT et al. 1999, KAMPEN 2004b) und *An. claviger*-Komplexe (KAMPEN et al. 2003).

All diese Testverfahren basieren auf interspezifischen Unterschieden in den Nukleotidabfolgen der ribosomalen Moskito-DNA (rDNA), insbesondere der ITS2 (internal transcribed spacer 2)-Regionen (Abb. 9; COL-

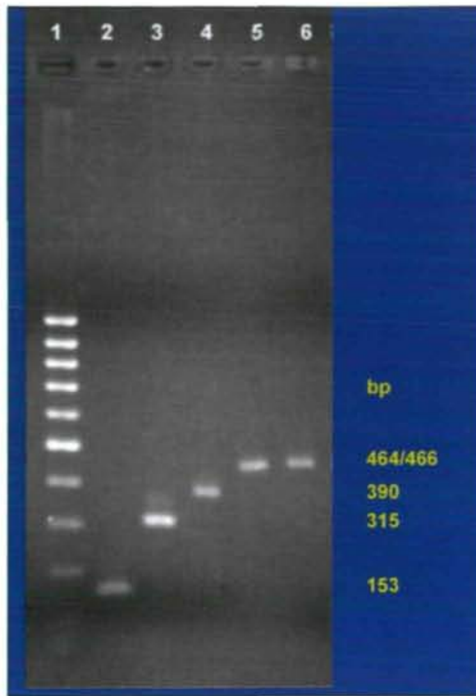


Abb. 7: spezies-spezifische PCR für fünf Zwillingsarten des *An. gambiae*-Komplexes (Spur 1: 100 bp-Längenstandard; 2: *An. quadriannulatus*; 3: *An. arabiensis*; 4: *An. gambiae* s.str.; 5: *An. melas*; 6: *An. merus*)

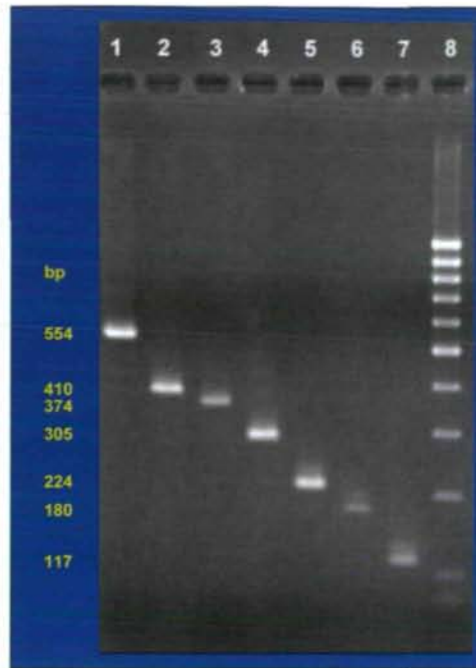


Abb. 8: spezies-spezifische PCR für sieben Zwillingsarten des paläarktischen *An. maculipennis*-Komplexes (Spur 1: *An. beklemishevi*; 2: *An. maculipennis* s.str.; 3: *An. labranchiae*; 4: *An. messeae*; 5: *An. melanoon*; 6: *An. sacharovi*; 7: *An. atroparvus*; 8: 100 bp-Längenstandard)

LINS & PASKEWITZ 1996). Während die kodierenden Regionen der rDNA aus evolutionärem Blickwinkel nämlich hoch konserviert und wenig variabel sind, weisen die Spacer-Regionen auch zwischen nah verwandten Arten signifikante Sequenzunterschiede auf (HILL & CRAMPTON 1994b; PASKEWITZ & COLLINS 1997). Diese können unter zu Hilfenahme der PCR, eines gattungsspezifischen Universalprimers und verschiedenen spezies-spezifischen Startermolekülen genutzt werden, um DNA-Fragmente artcharakteristischer Länge herzustellen, die auf einem mit Ethidiumbromid gefärbten Agarosegel leicht erkannt und der jeweiligen Moskitoart zugeordnet werden können. Kleinste Mückenteile, wie z. B. ein Bruchstück eines Beines, reichen für die DNA-Extraktion aus, so dass die Mücke für weitere Versuche verfügbar bleibt und sogar am Leben gelassen werden kann (KAMPEN et al. 1995). Steht etwas mehr Gewebe zur Verfügung (zwei bis drei Abdominal- oder Thorakalsegmente), so ist nicht einmal eine richtige DNA-Extraktion erforderlich. Es reicht, das Gewebe in Wasser grob zu zermahlen und kurz aufzukochen, um genügend DNA freizusetzen (PROFT et al. 1999; KAMPEN 2004b).

Im Idealfall kann zur Identifizierung einer gegebenen DNA eine Multiplex-PCR durchgeführt werden. Neben dem Universalprimer werden alle spezies-spezifischen Primer in einen Reaktionsansatz gegeben. Da letztere i. A. derart konstruiert sind, dass eine Kreuzhybridisierung mit DNA der Zwillingsarten ausgeschlossen ist, reagiert jeweils nur ein Primer und ist zusammen mit dem Universalprimer für die Bildung des spezies-spezifischen PCR-Produktes verantwortlich. Multiplex-PCRs wurden für den An *claviger*-Komplex (zwei spezies-spezifische Primer; KAMPEN et al. 2003), den An. *funestus*-Komplex (fünf spezies-spezifische Primer; KOEKEMOER et al. 2002), den An. *gambiae*-Komplex (fünf spezies-spezifische Primer; SCOTT et al. 1993; TOWNSON & ONAPA 1994) und den An. *maculipennis*-Komplex (sieben spezies-spezifische Primer; PROFT et al. 1999, KAMPEN 2004b) entwickelt.

Ungeachtet der immensen Vorteile der PCR-Diagnostik sollte das Untersuchungsmaterial vor der DNA-Amplifikation unbedingt auf klassische Weise mit der Stereolupe bis zum Artenkomplex bestimmt werden. Bei der Spezifitätstestung von PCR-Primern, die die Zwillingsarten des An. *claviger*-Komplexes differenzieren sollten, kam es nämlich zu einer Überraschung (KAMPEN et al. 2003): Nachdem der An. *petragnani*-spezifische Primer mit DNA zahlreicher *Culex-*, *Aedes-*, *Ochlerotatus-* sowie

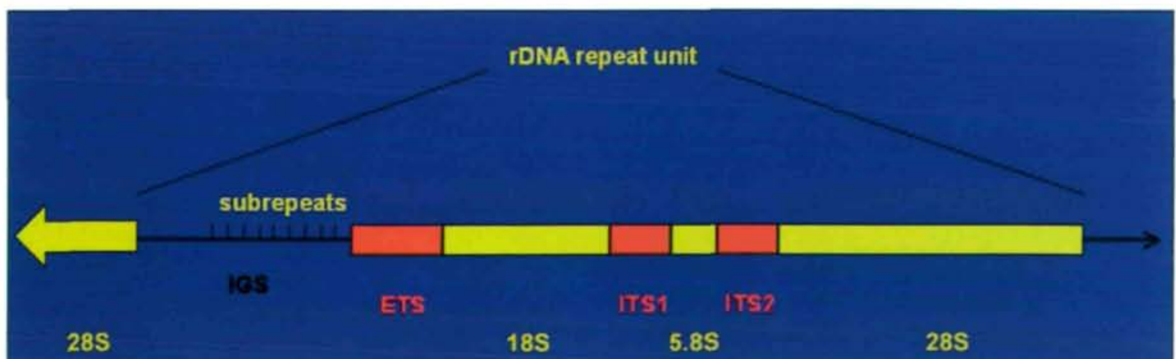


Abb. 9: Aufbau der ribosomalen Moskito-DNA (28S, 18S, 5,8S: für rDNA kodierende Gene; IGS: intergenic spacer; ITS1, ITS2: internal transcribed spacer; ETS: external transcribed spacer)

nicht zum *An. claviger*-Komplex gehörender *Anopheles*-Arten keine Kreuzhybridisierungen zeigte, bildete er – zusammen mit dem Universalprimer – in einer Multiplex-PCR mit DNA von *An. beklemishevi* ein Amplifikat, das nur zehn Basenpaare kürzer als das *An. claviger* s.str.-spezifische und daher auf dem Agarosegel kaum davon zu unterscheiden war (Abb. 10).

Eine weitere für systematische Studien einsetzbare Variante der PCR ist die RAPD (random amplified polymorphic DNA)-PCR, bei der ein einzelner, kurzer Primer unspezifisch an zahlreiche Bindungsstellen beider Stränge der DNA-Matrize hybridisieren und eine DNA-Amplifikation in Vorwärts- und Rückwartsrichtung initiieren soll. Als Reaktionsprodukte entstehen multiple Amplifikate, die idealerweise nach elektrophoretischer Auftrennung ein spezies-spezifisches Bandenmuster bilden. RAPD-Banden spiegeln einen hohen Grad an Polymorphismus wider (WILLIAMS et al. 1990) und scheinen daher insbesondere im Rahmen populationsgenetischer Studien geeignet, als Marker unterhalb der Artgrenze zu dienen (z. B. BALLINGER-CRABTREE et al. 1992; KAMBHAMPATI et al. 1992; FAVIA et al. 1994). In der Praxis ist die RAPD-PCR wegen mangelnder Reproduzierbarkeit jedoch mit Vorsicht anzuwenden (BLACK 1993): selbst kräftige Banden im Gel treten nicht bei jeder Amplifikationsreaktion in Erscheinung, und RAPD-PCR-Produktprofile können unter vermeintlich gleichen Reaktionsbedingungen in verschiedenen Laboratorien anders ausfallen (CRAMPTON 1994).

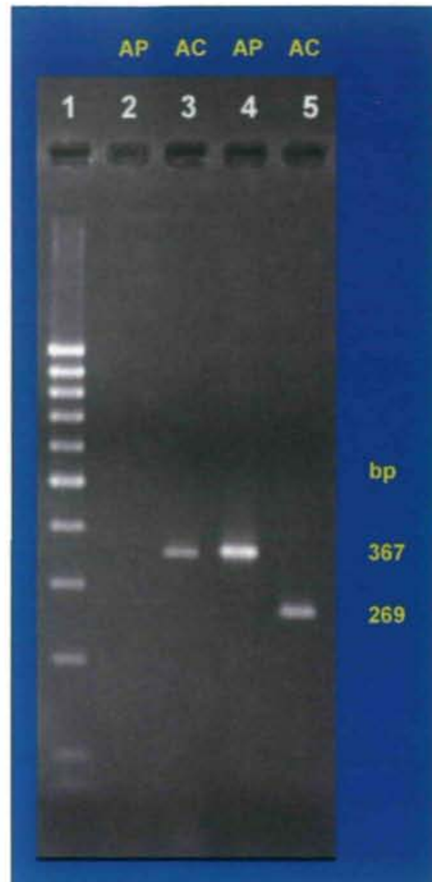


Abb. 10: Spezifitätstestung der diagnostischen PCR-Primer für die beiden Zwillingsarten des *An. claviger*-Komplexes (Spur 1: 100bp-Längenstandard; 2: *An. beklemishevi*-DNA + *An. petragnani*-spezifischer PCR-Primer; 3: *An. beklemishevi*-DNA + *An. claviger* s.str.-spezifischer Primer; 4: *An. petragnani*-DNA + *An. petragnani*-spezifischer Primer; 5: *An. claviger* s.str.-DNA + *An. claviger* s.str.-spezifischer Primer)

11 Ausblick

Die Zunahme Vektor-assoziierter Infektionskrankheiten als Folge der fortschreitenden Globalisierung, möglicherweise auch von Umwelt- und Klimaveränderungen (MAIER 2002), zeigt, dass die Ver- und Ausbreitung von Culiciden und anderen potenziellen Vektoren zukünftig mehr denn je auch in nicht-tropischen Gebieten beobachtet werden muss. Wie die Beispiele ‚Pferdepest-Virus' (MELLOR & LEAKE 2000) und ‚*Aedes albopictus*' (KNUDSEN et al. 1996) aus den vergangenen Jahren zeigen, ist die Einschleppung nach und Etablierung in Zentraleuropa sowohl für Pathogene als auch für potenzielle Krankheitsüberträger möglich.

Da die Identifizierung von Vektoren und Zwillingsarten mittlerweile auf dem Niveau der Nukleotidsequenz angelangt ist, die genaueste Informationen zum Organismus liefert, kann zukünftig nicht mit fundamental neuen Differenzierungsmethoden gerechnet werden. Durch methodische Weiterentwicklungen und Vereinfachungen werden vermutlich effizientere PCR-Varianten entwickelt werden, die einen schnelleren und größeren Probendurchsatz erlauben. Möglicherweise werden andere, besser geeignete DNA-Regionen für die Durchführung solcher Tests gefunden werden. Wenn nicht wirtschaftliche Interessen im Wege stünden, wären auch Schnellkits zur Differenzierung von Zwillingsarten denkbar.

Nichtsdestoweniger kann auch jetzt schon die Artidentifizierung mit Hilfe der molekularbiologischen Techniken mit großer Effizienz durchgeführt werden. Während die diagnostischen PCR-Tests aber auch von ungeschultem Personal schnell erlernt werden können, werden Entomologen mit detaillierten Kenntnissen zur Biologie und Ökologie der Vektoren benötigt, um bei deren Überwachung und Kontrolle mitzuwirken. Vektorkontrollmaßnahmen als Bestandteil der Bekämpfung von Krankheiten, die durch Arthropoden übertragen werden, geben logischerweise nur dort einen Sinn, wo der Vektor auch vorkommt, und die Strategie der Maßnahmen muss sich nach den biologischen Eigenheiten der jeweiligen Vektorspezies richten. Die Aufmerksamkeit sollte aber nicht nur der Verbreitung von Vektoren gelten, sondern auch popopulationsgenetische Untersuchungen einbeziehen: Nicht nur Arten können sich ausbreiten, sondern auch genetisch verankerte Eigenschaften, wie Insektizidresistenz oder Vektorkompetenz, zwischen verschiedenen Populationen einer Art.

12 Zusammenfassung

Trotz des Fehlens morphologischer Unterschiede können sich Zwillingsarten in ihren Verhaltensweisen, ökologischen Ansprüchen und Vektorkompetenzen erheblich voneinander unterscheiden. Gerade Malariaüberträger gehören häufig neben Nichtvektoren zu Artenkomplexen, und die Gattung *Anopheles* war es, die wegen des Phänomens des ‚Anophelismus sine malaria' überhaupt erst auf die Existenz von Zwillingsarten aufmerksam machte. Eine korrekte Artidentifizierung ist daher für eine Vektorbekämpfung von essenzieller Bedeutung. Über Jahrzehnte wurde an Methoden gearbeitet, mit deren Hilfe man Vektoren möglichst sicher, schnell und mit wenig Arbeitsaufwand von ihren vekorinkompetenten Zwillingsarten differenzieren konnte. In dieser Übersicht werden die wichtigsten Ansätze zur Identifizierung von *Anopheles*-Zwillingsarten präsentiert, angefangen bei klassischen Kreuzungsexperimenten über die ‚Zytotaxonomie' und die ‚Zymotaxonomie', die lange Zeit als die Standardmethoden galten, bis hin zu modernen molekularbiologischen Techniken. Aufgrund ihrer historischen Bedeutung für die Zwillingsartenforschung und ihrer Relevanz für die Malaria in Europa und Afrika erhalten der An. *maculipennis*- und der An. *gambiae*-Komplex besondere Gewichtung.

13 Literatur

ADAMSON R.E., CHANCE M.L., WARD R.D., FELICIANGELI D. & R.D.C. MAINGON (1991): Molecular approaches applied to the analysis of sympatric sandfly populations in endemic areas of Western Venezuela. — Parassitologia **33**: 45–53.

AITKEN T.H.G. (1945): Studies on the anopheline complex of western North America. — Univ. Calif. Publ. Entomol. **7**: 273–364.

ANYANWU G.I., DAVIES D.H., MOLYNEUX D.H., PHILLIPS A. & P.J. MILLIGAN (1993): Cuticular hydrocarbon discrimination/variation among strains of the mosquito, *Anopheles* (*Cellia*) *stephensi* LISTON. — Ann. Trop. Med. Parasitol. **87**: 269–275.

AUDTHO M., TASSANAKAJON A., BOONSAENG V., TPIANKIJAGUM S. & S. PANYIM (1995): Simple nonradioactive DNA hybridization method for identification of sibling species of *Anopheles dirus* (Diptera: Culicidae) complex. — J. Med. Entomol. **32**: 107–111.

AYALA F.J. & J.R. POWELL (1972): Allozymes as diagnostic characters of sibling species of *Drosophila*. — Proc. Natl. Acad. Sci. USA **69**: 1094–1096.

AYALA F.J. (1973): Two new subspecies of the *Drosophila willistoni* group (Diptera: Drosophilidae). — Pan-Pacif. Ent. **49**: 273–279.

BAIMAI V., HARRISON B.A. & L. SOMCHIT (1981): Karyotype differentiation of three anopheline taxa in the balabacensis complex of Southeast Asia (Diptera: Culicidae). — Genetica **57**: 81–86.

BALLINGER-CRABTREE M.E., BLACK IV, W.C. & B.R. MILLER (1992): Use of genetic polymorphisms detected by the random-amplified polymorphic DNA polymerase chain reaction (RAPD-PCR) for differentiation and identification of *Aedes aegypti* subspecies and populations. — Am. J. Trop. Med. Hyg. **47**: 893–901.

BARKER R.H. JR. (1990): DNA probe diagnosis of parasitic infections. — Exp. Parasitol. **70**: 494–499.

BAKER R.H., FRENCH W.L. & J.B. KITZMILLER (1962): Induced copulation in *Anopheles* mosquitoes. — Mosq. News **22**: 16–17.

BARR A.R. (1954): Hybridization experiments with some American dark-winged anophelines. — Exp. Parasitol. **3**: 445–457.

BARR A.R. (1988): The *Anopheles maculipennis* complex (Diptera: Culicidae) in western North America. — In: SERVICE M.W. (ed.), Biosystematics of Haematophagous Insects, Systematics Association Special Volume No. **37**, Clarendon Press, Oxford: 19–24.

BARR A.R. & P. GUPTAVANIJ (1988): *Anopheles hermsi*, n. sp., an unrecognized American species of the *Anopheles maculipennis* group (Diptera: Culicidae). — Mosq. Syst. **20**: 352–356.

BATES M. (1939a): Variation in the antepalmate hairs of larvae of the *Anopheles maculipennis* complex. — Riv. Malariol. **18**: 299–312.

BATES M. (1939b): The use of salt solutions for the demonstration of physiological differences between the larvae of certain European anopheline mosquitoes. — Am. J. Trop. Med. Hyg. **19**: 357–384.

BATES M. & L.W. HACKETT (1938): The distinguishing characteristics of the populations of *Anopheles maculipennis* found in Southern Europe. — Proc. Int. Congr. Entomol. **3**: 1555–1569.

BEEBE N.W., FOLEY D.H., SAUL A., COOPER L., BRYAN J.H. & T.R. BURKOT (1994): DNA probes for identifying the members of the *Anopheles punctulatus* complex in Papua New Guinea. — Am. J. Trop. Med. Hyg. **50**: 229–234.

BEEBE N.W. & A. SAUL (1995): Discrimination of all members of the *Anopheles punctulatus* complex by polymerase chain reaction-restriction fragment length polymorphism. — Am. J. Trop. Med. Hyg. **53**: 478–481.

BLACK W.C. IV (1993): PCR with arbitrary primers: approach with care. — Insect Mol. Biol. **2**: 1–6.

BOOTH D.R., MAHON R.J. & K.S. SRIPRAKASH (1991): DNA probes to identify members of the *Anopheles farauti* complex. — Med. Vet. Entomol. **5**: 447–454.

BORNKAMM G.W., DESGRANGES C. & L. GISSMANN (1983): Nucleic acid hybridization for the detection of viral genomes. — Curr. Top. Microbiol. Immunol. **104**: 287–298.

BRYAN J.H. (1979): Observations on the member species of the *Anopheles gambiae* complex in The Gambia, West Africa. — Trans. Roy. Soc. Trop. Med. Hyg. **73**: 463–466.

BRYAN J.H., DI DECO M.A., PETRARCA V. & M. COLUZZI (1982): Inversion polymorphism and incipient speciation in *Anopheles gambiae* s.str. in The Gambia, West Africa. — Genetica **59**: 167–176

BULLINI L. (1984): Enzyme variants in the identification of parasites and vectors: methodological aspects of the electrophoretic approach. — In: NEWTON B.N. & F. MICHAL (eds.), New Approaches to the Identification of Parasites and their Vectors, Trop. Dis. Res. Ser. 5, Schwabe & Co. AG, Basel: 53–69.

ÇAĞLAR S.S. & B. ALTEN (2000): Malaria situation and its vectors in Turkey. — In: ÇAĞLAR S.S., ALTEN B. & N. ÖZER (eds.), Proceedings of the 13th European Society for Vector Ecology Meeting, Antalya, Turkey, 24.–29.9.2000, Ankara, DTP: 234–245.

CARLSON D.A. & M.W. SERVICE (1979): Differentiation between species of the *Anopheles gambiae* GILES complex (Diptera: Culicidae) by analysis of cuticular hydrocarbons. — Ann. Trop. Med. Parasitol. **73**: 589–592.

CARLSON D.A. & J.F. WALSH (1981): Identification of two West African black flies (Diptera: Simuliidae) of the *Simulium damnosum* species complex by analysis of cuticular paraffins. — Acta Tropica **38**: 235–239.

CHAUVET G., DAVIDSON G. & J. DEJARDIN (1969): Validité d'une méthode chétotaxique de distinction des larves des espèces A & B du complexe *Anopheles gambiae* GILES à Madagascar. — Cah. ORSTOM Sér. Ent. Méd. Parasitol. **7**: 51–60.

CIANCHI R., SABATINI A., BOCCOLINI B., BULLINI L. & M. COLUZZI (1987): Electrophoretic evidence of reproductive isolation between sympatric populations of *Anopheles melanoon* and *An. subalpinus*. — 3rd Int. Congr. on Malaria and Babesiosis, Annecy, Frankreich, 7.-11.9.1987, Programme, p. 1560.

COCKBURN A.F. (1990): A simple and rapid technique for identification of large numbers of individual mosquitoes using DNA hybridization. — Arch. Insect Biochem. Physiol. **14**: 191–199.

COETZEE M. (1986): Practical use of hindleg banding patterns for identifying members of the *Anopheles gambiae* group of species. — Mosq. Syst. **18**: 134–138.

COETZEE M., HUNT R.H. & L.E.O. BRAACK (1993): Enzyme variation at the aspartate aminotransferase locus of the *Anopheles gambiae* complex. — J. Med. Entomol. **30**: 303–308.

COLLINS F.H., FINNERTY V. & V. PETRARCA (1988a): Ribosomal DNA-probes differentiate five cryptic species in the *Anopheles gambiae* complex. — Parassitologia **30**: 231–240.

COLLINS F.H., MEHAFFEY P.C., RASMUSSEN M.O., BRANDLING-BENNETT A.D., ODERA J.S. & V. FINNERTY (1988c): Comparison of DNA-probe and isoenzyme methods for differentiating *Anopheles gambiae* and *Anopheles arabiensis* (Diptera: Culicidae). — J. Med. Entomol. **25**: 116–120.

COLLINS F.H., MENDEZ M.A., RASMUSSEN M.O., MEHAFFEY P.C., BESANSKY N.J. & V. FINNERTY (1987): A ribosomal RNA gene probe differentiates member species of the *Anopheles gambiae* complex. — Am. J. Trop. Med. Hyg. **37**: 37–41.

COLLINS F.H., PETRARCA V., MPOFU S., BRANDLING-BENNETT A.D., WERE J.B.O., RASMUSSEN M.O. & V. FINNERTY (1988b): Comparison of DNA probe and cytogenetic methods for identifying field collected *Anopheles gambiae* complex mosquitoes. — Am. J. Trop. Med. Hyg. **39**: 545–550.

COLLINS F.H. & S.M. PASKEWITZ (1996): A review of the use of ribosomal DNA (rDNA) to differentiate among cryptic *Anopheles* species. Insect Mol. Biol. **5**: 1–9.

COLUZZI M. (1964): Morphological divergences in the *Anopheles gambiae* GILES complex. — Riv. Malariol. **43**: 197–232.

COLUZZI M. (1968): Cromosomi politenici delle cellule nutrici ovariche nel complesso *gambiae* del genere *Anopheles*. — Parassitologia **10**: 179–183.

COLUZZI M. (1970): Sibling species in *Anopheles* and their importance in malariology. — Misc. Publ. Entomol. Soc. Am. **7**: 63–77.

COLUZZI M. (1988): Anopheline mosquitoes: genetic methods for species differentiation. — In: WERNSDORFER W.H. & I. MCGREGOR (eds.), Malaria – Principles and Practice of Malariology, Vol. **1**, Churchill Livingstone, Edinburgh, London, Melbourne, New York: 411–430.

COLUZZI M., PETRARCA V. & M.A. di DECO (1985): Chromosomal inversion intergradiation and incipient speciation in *Anopheles gambiae*. — Boll. Zool. **52**: 45–63.

COLUZZI M. & A. SABATINI (1967): Cytogenetic observation on species A and B of the *Anopheles gambiae* complex. — Parassitologia **9**: 73–88.

COLUZZI M., SABATINI A., PETRARCA V. & M.A. di DECO (1977): Behavioral divergences between mosquitoes with different inversion karyotypes in polymorphic populations of the *Anopheles gambiae* complex. — Nature **266**: 832–833.

COLUZZI M., SABATINI A., PETRARCA V. & M.A. di DECO (1979): Chromosomal differentiation and adaptation to human environments in the *Anopheles gambiae* complex.— Trans. Roy. Soc. Trop. Med. Hyg. **73**: 483–497.

COMINGS D.E., AVELINO E., OKADA T.A. & A.E. WYANDT (1973): Mechanism of chromosome banding. V. Quinacrine banding. — Chromosoma **50**: 111–145.

COOPER L., COOPER R.D. & T.R. BURKOT (1991): The *Anopheles punctulatus* complex: DNA probes for identifying species using isotopic, chromogenic, and chemiluminescence detection systems. — Exp. Parasitol. **73**: 27–35.

COPE S.E., STODDARD R.J. & A.R. BARR (1988): The distribution of an undescribed member of the *Anopheles maculipennis* complex in California. — Proc. Calif. Mosq. Vector Contr. Assoc. **56**: 130–134.

CORNEL A.J., PORTER C.H. & F.H. COLLINS (1996): Polymerase chain reaction species diagnostic assay for *Anopheles quadrimaculatus* cryptic species (Diptera: Culicidae) based on ribosomal DNA ITS2 sequences. — J. Med. Entomol. **33**: 109–116.

CORRADETTI A. (1937): Revisione critica degli studi sul comportamento sessuale e sugli incroci tra le diverse varietà di *Anopheles maculipennis*. — Riv. Parassitol. **1**: 329–341.

COSTANTINI C., SAGNON N'F., ILBOUDO-SANOGO E., COLUZZI M. & D. BOCCOLINI (1999): Chromosomal and bionomic heterogeneities suggest incipient speciation in *Anopheles funestus* from Burkina Faso. — Parassitologia **41**: 595–611.

CRAMPTON J.M. (1994): Molecular studies of insect vectors of malaria. — Adv. Parasitol. **34**: 1–31.

CRAMPTON J.M., KNAPP T. & R. WARD (1987): DNA probes for vector taxonomy. — In: HART D.T. (Ed.): Leishmaniasis, Plenum Press, London, New York: 957–963.

CROSSKEY R.W. (1988): Old tools and new taxonomic problems in bloodsucking insects. — In: SERVICE M.W. (ed.), Biosystematics of Haematophagous Insects, Systematics Association Special Volume No. **37**, Clarendon Press, Oxford: 19–24.

DAVIDSON G. (1964a): The five mating-types in the *Anopheles gambiae* complex. — Riv. Malariol. **43**: 167–183.

DAVIDSON, G. (1964b): *Anopheles gambiae*, a complex of species. — Bull. Wld Hlth Org. **31**: 625–634.

DAVIDSON G. (1974): Genetic Control of Insect Pests. Academic Press, London, New York, 158 pp.

DAVIDSON G. & C.E. JACKSON (1962): Incipient speciation in *Anopheles gambiae* GILES. — Bull. Wrld Hlth Org. **27**: 303–305.

DAVIDSON G., PATERSON H.E., COLUZZI M., MASON G.F. & D.W. MICKS (1967): The *Anopheles gambiae* complex. — In: WRIGHT J.W. & R. PAL (eds.), Genetics of Insect Vectors of Disease, Elsevier Publ., Amsterdam, London, New York: 211–250.

DAVIDSON, G. & G.B. WHITE (1972): The crossing characteristics of a new, sixth species in the *Anopheles gambiae* complex. — Trans. Roy. Soc. Trop. Med. Hyg. **66**: 531–532.

DE BUCK A., SCHOUTE E. & N.H. SWELLENGREBEL (1934): Crossbreeding experiments with Dutch and foreign races of *Anopheles maculipennis*. — Riv. Malariol. **8**: 237–264.

DERUAZ D., DERUAZ J. & J. PICHOT (1991): Correspondence analysis of larval chaetotaxy in the „*Anopheles maculipennis* complex" (Diptera: Culicidae). — Ann. Parasitol. Hum. Comp. **66**: 166–172.

DE ZULUETA J., RAMSDALE C., CIANCHI R., BULLINI L. & M. COLUZZI (1983): Observations on the taxonomic status of *Anopheles sicaulti*. — Parassitologia **25**: 73–92.

ENGLEBERG N.C. & B.I. EISENSTEIN (1992): Detection of microbial nucleic acids for diagnostic purposes. — Annu. Rev. Med. **43**: 147–155.

ELLISON J.R. & H.J. BARR (1971): Differences in quinacrine staining of the chromosomes of a pair of sibling species: *Drosophila melanogaster* and *Drosophila simulans*. — Chromosoma **34**: 424–435.

FANTINI B. (1994) Anophelism without malaria: an ecological and epidemiological puzzle. — Parassitologia **36**: 83–106.

FAVIA G., DIMOPOULOS G., DELLA TORRE A., TOURÉ Y.T., COLUZZI M. & C. LOUIS (1994): Polymorphisms detected by random PCR distinguish between different chromosomal forms of *Anopheles gambiae*. — Proc. Natl. Acad. Sci. USA **91**: 10315–10319.

FOLEY D.H. & J.H. BRYAN (1993): Electrophoretic keys to identify members of the *An. punctulatus* complex of vector mosquitoes in Papua New Guinea. — Med. Vet. Entomol. **7**: 49–53.

FRENCH W.L., BAKER R.H. & J.B. KITZMILLER (1962): Preparation of mosquito chromosomes. — Mosq. News **22**: 377–383.

FRITZ G.N., NARANG S.K., KLINE D.L., SEAWRIGHT J.S., WASHINO R.K., PORTER C.H. & F.H. COLLINS (1991): Diagnostic characterization of *Anopheles freeborni* and *An. hermsi* by hybrid crosses, frequences of polytene X chromosomes and rDNA restriction enzyme fragments. — J. Am. Mosq. Contr. Assoc. **7**: 198–206.

FRIZZI G. (1947): Cromosomi salivari in *Anopheles maculipennis*. — Sci. Genet. **3**: 67–79.

FRIZZI G. (1949): Genetica di populazioni in *Anopheles maculipennis*. — Ric. Scient. **6**: 544–552.

FRIZZI G. (1953): Etude cytogénétique d'*Anopheles maculipennis* en Italie. — Bull. Wrld Hlth Org. **9**: 335–344.

GALE K.R. & J.M. CRAMPTON (1987a): DNA probes for species identification of mosquitoes in the *Anopheles gambiae* compex. — Med. Vet. Entomol. **1**: 127–136.

GALE K.R. & J.M. CRAMPTON (1987b): A DNA probe to distinguish the species *Anopheles quadriannulatus* from other species of the *Anopheles gambiae* complex. — Trans. Roy. Soc. Trop. Med. Hyg. **81**: 842–846.

GALE K.R. & J.M. CRAMPTON (1988): Use of a male-specific DNA probe to distinguish female mosquitoes of the *Anopheles gambiae* species complex. — Med. Vet. Entomol. **2**: 61/1–61/3 (SS).

GATTI M., SANTINI G., PIMPINELLI S. & M. COLUZZI (1977): Fluorescence banding techniques in the identification of sibling species of the *Anopheles gambiae* complex. — Heredity **38**: 105–108.

GILLIES M.T. & M. COETZEE (1987): A supplement to the Anophelinae of Africa south of the Sahara. — Publ. S. Afr. Inst. Med. Res. **55**, Johannesburg, Südafrika: 96–119.

GILLIES M.T. & B. DE MEILLON (1968): The Anophelinae of Africa south of the Sahara (Ethiopian zoogeographical region). — Publ. S. Afr. Inst. Med. Res. **54**, 2nd Ed., Johannesburg, Südafrika: 203–224.

HACKETT L.W., MARTINI E. & A. MISSIROLI (1932): The races of *A. maculipennis*. — Ann. J. Hyg. **16**: 137–162.

HAMILTON R.J. & M.W. SERVICE (1983): Value of cuticular and internal hydrocarbons for the identification of larvae of *Anopheles gambiae* GILES, *Anopheles arabiensis* PATTON and *Anopheles melas* THEOBALD. — Ann. Trop. Med. Parasitol. **77**: 203–210.

HARRIS H. & D.A. HOPKINSON (1977): Handbook of Enzyme Electrophoresis in Human Genetics. — North-Holland Publ., Amsterdam, 374 pp.

HARTAS J., WHELAN P., SRIPRAKASH K.S. & D. BOOTH (1992): Oligonucleotide probes to identify three sibling species of the *Anopheles farauti* LAVERAN (Diptera: Culicidae) complex. — Trans. Roy. Soc. Trop. Med. Hyg. **86**: 210–212.

HILL S.M. & J.M. CRAMPTON (1994a): Synthetic DNA probes to identify members of the *Anopheles gambiae* complex and to distinguish the two major vectors of malaria within the complec, *An. gambiae* s.s. and *An. arabiensis*. — Am. J. Trop. Med. Hyg. **50**: 312–321.

HILL S.M. & J.M. CRAMPTON (1994b): DNA-based methods for the identification of insect vectors. — Ann. Trop. Med. Parasitol. **88**: 227–250.

HILL S.M., URWIN R. & J.M. CRAMPTON (1991b): A comparison of non-radioactive labeling and detection systems with synthetic oligonucleotide probes for the species identification of mosquitoes in the *Anopheles gambiae* complex. — Am. J. Trop. Med. Hyg. **44**: 609–622.

HILL S.M., URWIN R. & J.M. CRAMPTON (1992): A simplified, non-radioactive DNA probe protocol for the field identification of insect vector specimens. — Trans. Roy. Soc. Trop. Med. Hyg. **86**: 213–215.

HILL S.M., URWIN R., KNAPP T.F. & J.M. CRAMPTON (1991a): Synthetic DNA probes for the identification of sibling species in the *Anopheles gambiae* complex. — Med. Vet. Entomol. **5**: 455–463.

HUNT R. (1973): A cytological technique for the study of *Anopheles gambiae* complex. — Parassitologia **15**: 137–139.

HUNT R.H. & M. COETZEE (1986a): Chromosomal and electrophoretic identification of a sample of *Anopheles gambiae* group (Diptera: Culicidae) from the island of Grand Comoros, Indian Ocean. — J. Med. Entomol. **23**: 655–660.

HUNT R.H. & M. COETZEE (1986b): Field sampling of *Anopheles* mosquitoes for correlated cytogenetic, electrophoretic and morphological studies. — Bull. Wld Hlth Org. **64**: 897–900.

HUNT R.H., COETZEE M. & M. FETTENE (1998): The *Anopheles gambiae* complex: a new species from Ethiopia. — Trans. Roy. Soc. Trop. Med. Hyg. **92**: 231–235.

ISMAIL I.A.H. & E.I. HAMMOUD (1968): The use of coeloconic sensillae on the female antenna in differentiating the members of the *Anopheles gambiae* Giles complex. — Bull. Wld Hlth Org. **38**: 814–821.

JACKSON L.L. & G.J. BLOMQUIST (1976): Insect waxes. — In: KOLATTUKUDY P.E. (ed.): Chemistry and Biochemistry of Natural Waxes, Elsevier Publ., Amsterdam: 201–233.

JAENSON T.G.T., LOKKI J. & A. SAURA (1986): *Anopheles* (Diptera: Culicidae) and malaria in northern Europe, with special reference to Sweden. — J. Med. Entomol. **23**: 68–75.

JETTEN T.H. & W. TAKKEN (1994): Anophelism without malaria in Europe – A review of the ecology and distribution of the genus *Anopheles* in Europe. — Wageningen Agric. Univ. Papers **94**–5: 1–69.

KAMBHAMPATI S., BLACK W.C. IV & K.S. RAI (1992): Random amplified polymorphic DNA of mosquito species and populations (Diptera: Culicidae): techniques, statistical analysis, and applications. — J. Med. Entomol. **29**: 939–945.

KAMHAWI S., MOLYNEUX D.H., KILLICK-KENDRICK R., MILLIGAN P.J.M., PHILLIPS A., WILKES T.J. & M. KILLICK-KENDRICK (1987): Two populations of *Phlebotomus ariasi* in the Cevennes focus of leishmaniasis in the south of France revealed by analysis of cuticular hydrocrabons. — Med. Vet. Entomol. **1**: 97–102.

KAMPEN H. (2004a): Evidence from DNA sequence data for synonymity of the *Anopheles maculipennis* sibling species, *An. subalpinus* and *An. melanoon* (Diptera: Culicidae). — In Vorbereitung.

KAMPEN H. (2004b): Integration of *Anopheles beklemishevi* (Diptera: Culicidae) in a PCR assay diagnostic for palaearctic *An. maculipennis* sibling species. — In Vorbereitung.

KAMPEN H., STERNBERG A., PROFT J., BASTIAN S., SCHAFFNER F., MAIER W.A. & H.M. SEITZ (2003): Polymerase chain reaction-based differentiation of the mosquito sibling species *Anopheles claviger* s.s. and *Anopheles petragnani* (Diptera: Culicidae). — Am. J. Trop. Med. Hyg. **69**: 195–199.

KAMPEN, H., STRAIF S., MAIER W.A. & H.M. SEITZ (1995): Comparison of PCR and cytotaxonomy in the differentiation of *Anopheles gambiae* sibling species exemplified in mosquito specimens from Cameroon. — Appl. Parasitol. **36**: 274–278.

KITTAYAPONG P., CLARK J.M., EDMAN J.D., POTTER T.L., LAVINE B.K., MARION J.R. & M. BROOKS (1990): Cuticular lipid differences between the malaria vector and non-vector forms of the *Anopheles maculatus* complex. — Med. Vet. Entomol. **4**: 405–413.

KITZMILLER J.B. (1967): Mosquito cytogenetics. — In: WRIGHT J.W. & R. PAL (eds.), Genetics of Insect Vectors of Disease, Elsevier Publ., Amsterdam, London, New York: 133–150.

KITZMILLER J.B., FRIZZI G. & R.H. BAKER (1967): Evolution and speciation within the maculipennis complex of the genus *Anopheles*. — In: WRIGHT J.W. & R. PAL (eds.), Genetics of Insect Vectors of Disease, Elsevier Publ., Amsterdam, London, New York: 151–210.

KNUDSEN A.B., ROMI R. & G. MAJORI (1996): Occurrence and spread in Italy of *Aedes albopictus* with implications for its introduction into other parts of Europe. — J. Am. Mosq. Contr. Assoc. **12**: 177–183.

KOEKEMOER L.L., KAMAU L, HUNT R.H. & M. COETZEE (2002): A cocktail polymerase chain reaction assay to identify members of the *Anopheles funestus* (Diptera: Culicidae) group. — Am. J. Trop. Med. Hyg. **66**: 804–811.

KORVENKONTIO P., LOKKI J., SAURA A. & I. ULMANEN (1979): *Anopheles maculipennis* complex (Diptera: Culicidae) in Northern Europe: species diagnosis by egg structure and enzyme polymorphism. — J. Med. Entomol. **16**: 169–170.

LAVEN H. (1950/51): Der Schuppenindex als Unterscheidungsmerkmal der Arten in der *Anopheles maculipennis*-Gruppe. — Z. Tropenmed. Parasitol. **2**: 111–124.

LE SUEUR D. & B.L. SHARP (1991): Temperature-dependent variation in *Anopheles merus* larval head capsule width and adult wing length: implications for anopheline taxonomy. — Med. Vet. Entomol. **5**: 55–62.

LINLEY J.R., KAISER P.E. & A.F. COCKBURN (1993): A description and morphometric study of the eggs of species of the *Anopheles quadrimaculatus* complex (Diptera: Culicidae). — Mosq. Syst. **25**: 124–147.

LINTON Y.-M., SMITH L. & R. HARBACH (2002): Observations on the taxonomic status of *Anopheles subalpinus* HACKETT & LEWIS and *An. melanoon* HACKETT. — Eur. Mosq. Bull. **13**: 1–7.

LOCKEY K.H. (1980): Insect cuticular hydrocarbons. — Comp. Biochem. Physiol. **65B**: 457–462.

LOKKI J., SAURA A., KORVENKONTIO P. & I. ULMANEN (1979): Diagnosing adult *Anopheles* mosquitoes. — Aquilo Ser. Zool. **20**: 5–12.

MA M., BEIER J.C., PETRARCA V., GWADZ R.W., ZHANG J.-Z., SONG Q. & D.K. KOECH (1990): Differentiation of *Anopheles gambiae* and *An. arabiensis* (Diptera: Culicidae) by ELISA using immunoaffinity-purified antibodies to vitellogenin. — J. Med. Entomol. **27**: 564–569.

MAHON R.J.; GREEN C.A. & R. HUNT (1976): Diagnostic allozymes for routine identification of adults of the *Anopheles gambiae* complex (Diptera, Culicidae). — Bull. Ent. Res. **66**: 25–31.

MAIER M.W. (2002): Umweltveränderungen und deren Einflüsse auf krankheitsübertragende Arthropoden in Mitteleuropa am Beispiel der Stechmücken. — Denisia **6** (NF 184): 535–547.

MANONMANI A., TOWNSON H., ADENIRAN T., JAMBULINGAM P., SAHU S. & T. VIJAYAKUMAR (2001): rDNA-ITS2 polymerase chain reaction assay for the sibling species of *Anopheles fluviatilis*. — Acta Tropica **78**: 3–9.

MARCHAND R.P. & A.E.P. MNZAVA (1985): A field test of a biochemical key to identify members of the *Anopheles gambiae* group of species in north-east Tanzania. — J. Trop. Med. Hyg. **88**: 205–210.

MAYR E. (1942): Systematics and the Origin of Species. — Columbia University Press, New York, 334 pp.

MAYR E. (1967): Artbegriff und Evolution. — Paul Parey Verlag, Hamburg, Berlin, 617 pp.

MELLOR P.S. & C.J. LEAKE (2000): Climatic and geographic influences on arboviral infections and vectors. — Rev. Sci. Tech. Off. Int. Epiz. **19**: 41–54.

MEZZANOTTE R. & L. FERRUCCI (1978): Recognition of the sibling species *Anopheles atroparvus* (van THIEL) and *Anopheles labranchiae* (FALLERONI) (Diptera: Culicidae) on the basis of Q and C banding. — Mon. Zool. Ital. **12**: 211–218.

MILES S.J. (1979): A biochemical key to adult members of the *Anopheles gambiae* group of species (Diptera: Culicidae). — J. Med. Entomol. **15**: 297–299.

MILLEST A.L. (1992): Identification of members of the *Simulium ochraceum* species complex in the three onchocerciasis foci in Mexico. — Med. Vet. Entomol. **6**: 23–28.

MILLIGAN P.J.M., PHILLIPS A., MOLYNEUX D.H., SUBBARAO S.K. & G.B. WHITE (1986): Differentiation of *Anopheles culicifacies* GILES (Diptera: Culicidae) sibling species by analysis of cuticular components. — Bull. Ent. Res. **76**: 529–537.

MNZAVA A.E.P. & W.L. KILAMA (1986): Observations on the distribution of the *Anopheles gambiae* complex in Tanzania. — Acta Tropica **43**: 277–282.

MOHRIG W. (1969): Die Culiciden Deutschlands – Untersuchungen zur Biologie, Taxonomie und Ökologie der einheimischen Stechmücken. — Parasitol. Schriftenreihe Heft **18**, Gustav Fischer, Jena, 260 pp.

MOLYNEUX D.H., OKOLO C.J., LINES J.D. & M. KAMHAWI (1990): Variation in fluorescin-labelled lectin staining of salivary glands in the *Anopheles maculipennis* complex. — Med. Vet. Entomol. **4**: 459–462.

MOSHA F.W. & C.M. MUTERO (1982): The influence of salinity on larval development and population dynamics of *Anopheles merus* DÖNITZ (Diptera: Culicidae). — Bull. Ent. Res. **72**: 119–128.

MUIRHEAD-THOMSON R.C. (1951): Studies on salt-water and freshwater *Anopheles gambiae* on the East African coast. — Bull. Ent. Res. **41**: 487–502.

OKEREKE T.A. (1980): Hybridization studies on sibling species of the *Anopheles gambiae* GILES complex (Diptera: Culicidae) in the laboratory. — Bull. Ent. Res. **70**: 391–398.

OKOLO C.J., MOLYNEUX D.H., WALLBANKS K.R. & I. MAUDLIN (1988): Fluorescein conjugated lectins identify different carbohydrate residues on *Glossina* peritrophic membranes. — Trop. Med. Parasitol. **39**: 208–210.

PANYIM S., YASOTHORNSRIKUL S., TUNGPRADUBKUL S., BAIMAI V., ROSENBERG R., ANDRE R.G. & C.A. GREEN (1988): Identification of isomorphic malaria vectors using a DNA probe. — Am. J. Trop. Med. Hyg. **38**: 47–49.

PASKEWITZ S.M. & F.H. COLLINS (1997): PCR amplification of insect ribosomal DNA. — In: CRAMPTON J.M., BEARD C.B. & C. LOUIS (eds.), The Molecular Biology of Insect Disease Vectors, Chapman & Hall, London: 374–383

PERRONE J.B., DE MAIO J. & A. SPIELMAN (1986): Regions of mosquito salivary gland distinguished by surface lectin binding characteristics. — Insect Biochem. **16**: 313–318.

PEUS F. (1942): Die Stechmücken und ihre Bekämpfung. Teil I: Die Fiebermücken des Mittelmeergebietes. — Verlag Dr. Paul Schöps, Leipzig, 150 pp.

PHILLIPS A., KAMHAWI S., MILLIGAN P.J.M. & D.H. MOLYNEUX (1987): Cuticular hydrocarbon analysis as a tool in sandfly identification. — In: HART D.T. (ed.): Leishmaniasis, Plenum Press, New York: 225–234.

PHILLIPS A., LE PONT F., DESJEUX P., BROOMFIELD G. & D.H. MOLYNEUX (1990a): Separation of *Psychodopygus carrerai carrerai* and *P. yucumensis* (Diptera: Psychodidae) by gas chromatography of cuticular hydrocarbons. — Acta Tropica **47**: 145–149.

PHILLIPS A. & P. MILLIGAN (1986): Cuticular hydrocarbons distinguish sibling species of vectors. — Parasitol. Today **2**: 180–181.

PHILLIPS A., MILLIGAN P.J.M., BROOMFIELD G. & D.H. MOLYNEUX (1988): Identification of medically important Diptera by analysis of cuticular hydrocarbons. — In: SERVICE M.W. (ed.), Biosystematics of Haematophagous Insects, Systematics Association Special Volume No. **37**, Clarendon Press, Oxford: 39–59.

PHILLIPS A., SABATINI A., MILLIGAN P.J.M., BOCCOLINI D., BROOMFIELD G. & D.H. MOLYNEUX (1990b): The *Anopheles maculipennis* complex (Diptera: Culicidae): comparison of the cuticular hydrocarbon profiles determined in adults of five palaearctic species. — Bull. Ent. Res. **80**: 459–464.

PHILLIPS A., WALSH J.F., GARMS R., MOLYNEUX D.H., MILLIGAN P. & IBRAHIM G. (1985): Identification of adults of the *Simulium damnosum* complex using hydrocarbon analysis. — Trop. Med. Parasit. **36**: 97–101.

PORTER C.H. & F.H. COLLINS (1991): Species-diagnostic differences in a ribosomal DNA internal transcribed spacer from the sibling species *Anopheles freeborni* and *Anopheles hermsi* (Diptera: Culicidae). — Am. J. Trop. Med. Hyg. **45**: 271–279.

POST R.J. (1985): DNA probes for vector identification. — Parasitol. Today **1**: 89–90.

POST R.J. & J.M. CRAMPTON (1988): The taxonomic use of variation in repetitive DNA sequences in the *Simulium damnosum* complex — In: SERVICE M.W. (ed.), Biosystematics of Haematophagous Insects, Systematics Association Special Vol. No. **37**, Clarendon Press, Oxford: 245–256.

PRATT H.D. (1952): Notes on *Anopheles earlei* and other American species of the *Anopheles maculipennis* complex. — Am. J. Trop. Med. Hyg. **1**: 484–493.

PROFT J., MAIER W.A. & H. KAMPEN (1999): Identification of six sibling species of the *Anopheles maculipennis* complex (Diptera: Culicidae) by a polymerase chain reaction assay. — Parasitol. Res. **85**: 837–843.

RAMME W. (1930): Revisionen und Neubeschreibungen in der Gattung *Pholidoptera* Wesm. (Orth., Tettigon.). — Mitt. Zool. Mus. Berlin **16**: 789–821.

READY P.D., LAINSON R., SHAW J.J. & A.A. SOUZA (1991): DNA probes for distinguishing *Psychodopygus wellcomei* from *Psychodopygus complexus* (Diptera: Psychodidae). — Mem. Inst. Oswaldo Cruz **86**: 41–49.

REID J.A. (1973): Larval differences between sympatric populations from Kaduna, West Africa, of species A and B of the *Anopheles gambiae* group. — Parassitologia **15**: 87–98.

REID J.A. (1975): Pupal differences between species A and B of the *Anopheles gambiae* group from Kaduna, West Africa. — Mosq. Syst. **7**: 299–302.

RIBBANDS C.R. (1944): Differences between *Anopheles melas* and *Anopheles gambiae*. II. Salinity relations of larvae and maxillary palp banding of adult females. — Ann. Trop. Med. Parasitol. **38**: 87–99.

RICHARDSON B.J., BAVERSTOCK P.R. & M. ADAMS (1986): Allozyme Electrophoresis. A Handbook for Animal Systematics and Population Studies. —Academic Press, Sydney, 410 pp.

RYAN L., PHILLIPS A., MILLIGAN P.J.M., LAINSON R., MOLYNEUX D.H. & J.J. SHAW (1986): Separation of female *Psychodopogus wellcomei* and *P. complexus* (Diptera: Psychodidae) by cuticular hydrocarbon analysis. — Acta Tropica **43**: 85–89.

SCHAFFNER F., ANGEL G., GEOFFROY B., HERVY J.P., RHAIEM A. & J. BRUNHES (2001): The Mosquitoes of Europe/Les Moustiques d'Europe. An Identification and Training Programme (CD-Rom). — IRD Éditions & EID Méditerranée, Montpellier, France.

SCOTT J.A., BROGDON W.G. & F.H. COLLINS (1993): Identification of single specimens of the *Anopheles gambiae* complex by the polymerase chain reaction. — Am. J. Trop. Med. Hyg. **49**: 520–529.

SERVICE M.W. (1985): *Anopheles gambiae*: Africa's principal malaria vector, 1902–1984. — Bull. Ent. Soc. Am., Fall: 8–12.

SERVICE M.W. (2000): Anopheline mosquitoes (Anophelinae). — In: SERVICE M.W. (ed.), Medical Entomolgy for Students, 2nd Ed., Cambridge University Press, Cambridge: 33–51.

SERVICE M.W. & H. TOWNSON (2002): The *Anopheles* vector. — In: WARRELL D.A. & H.M. GILLES (eds.), Essential Malariology, 4th Ed., Arnold Publ., London, New York, New Delhi: 59–84.

STEGNII V.N. (1987): Systematic reorganization of the architectonics of polytene chromosomes during ontogeny and phylogeny of malarial mosquitoes. I. Differences in the nuclear structure of the somatic and generative tissues. — Genetika **23**: 821–826.

STEGNII V.N. & V.M. KABANOVA (1978): Cytoecological study of indigenous populations of the malaria mosquito in the territory of the U.S.S.R.: I. Identification of a new species of *Anopheles* in the *maculipennis* complex by the cytodiagnostic method. — Mosq. Syst. **10**: 1–12.

STEGNIY V.N. (1982): Genetic adaptation and speciation in sibling species of the Eurasian maculipennis complex. — In: STEINER W.W.M., TABACHNIK W.J., RAI K.S. & S. NARANG (eds.), Recent Developments in the Genetics of Insect Disease Vectors, Stipes Publ., Champaign, IL: 454–464.

STEINER W.W.M. & D.J. JOSLYN (1979): Electrophoretic techniques for the genetic study of mosquitoes. — Mosq. News **39**: 35–54.

TCHEN P., ANXOLABEHERE D., NOUAUD D. & G. PÉRIQUET (1985): Hybridization on squashed flies: a method to detect gene sequences in individual *Drosophila*. — Anal. Biochem. **150**: 415–420.

TOURÉ Y.T. (1989): The current state of studies of malaria vectors and the antivectorial campaign in West Africa. — Trans. Roy. Soc. Trop. Med. Hyg. **83** (Suppl.): 39–41.

TOWNSON H. & A.W. ONAPA (1994): Identification by rDNA-PCR of *Anopheles bwambae*, a geothermal spring species of the *An. gambiae* complex. — Insect Mol. Biol. **3**: 279–282.

VAJIME C.G. & R.W. DUNBAR (1975): Chromosomal identification of eight species of the subgenus *Edwardsellum* near and including *Simulium* (*Edwardsellum*) *damnosum* THEOBALD (Diptera: Simuliidae). — Tropenmed. Parasitol. **26**: 111-138.

VAN THIEL P.H. (1927): Sur l'origine des variations de taille de l'*Anopheles maculipennis* dans les Pays-Bas. — Bull. Soc. Path. Exot. **20**: 366–390.

WALTON C., HANDLEY J.M., KUVANGKADILOK C., COLLINS F.H., HARBACH R.E. & V. BAIMAI (1999): Identification of five species of the *Anopheles dirus* complex from Thailand, using allele-specific polymerase chain reaction. — Med. Vet. Entomol. **13**: 24–32.

WEISBLUM B. & E. HAENSSLER (1974): Fluorometric properties of the bibenzimidazol derivative Hoechst 33258, a fluorescent probe specific for AT concentration in chromosomal DNA. — Chromosoma **46**: 255–260.

WHITE G.B. (1971): Chromosomal evidence for natural interspecific hybridization by mosquitoes of the *Anopheles gambiae* complex. — Nature **231**: 184–185.

WHITE G.B. (1973): Comparative studies on sibling species of the *Anopheles gambiae* GILES complex (Dipt., Culicidae). III. The distribution, ecology, behaviour and vectorial importance of species D in Bwamba County, Uganda, with an analysis of biological, ecological, morphological and cytogenetical relationships of Ugandan species D. — Bull. Ent. Res. **63**: 65–97.

WHITE G.B. (1974): *Anopheles gambiae* complex and disease transmission in Africa. — Trans. Roy. Soc. Trop. Med. Hyg. **68**: 278–298.

WHITE G.B. (1977): The place of morphological studies in the investigation of *Anopheles* sibling species. — Mosq. Syst. **9**: 1–24.

WHITE G.B. (1978) Systematic reappraisal of the *Anopheles maculipennis* complex. — Mosq. Syst. **10**: 13–44.

WHITE G.B. (1984): Needs and progress in the application of new techniques to mosquito identification. — In: NEWTON B.N. & F. MICHAL (eds.), New Approaches in the Identification of Parasites and their Vectors, Trop. Dis. Res. Ser. **5**, Schwabe & Co. AG, Basel: 293–332.

WHITE G.B. (1985): *Anopheles bwambae* sp.n., a malaria vector in the Semliki Valley, Uganda, and its relationships with other sibling species of the *An. gambiae* complex (Diptera: Culicidae). — Syst. Entomol. **10**: 501–522.

WHITE G.B. & J.N. MUNISS (1972): Taxonomic value of spermatheca size for distinguishing four members of the *Anopheles gambiae* complex in East Africa. — Bull. Wld Hlth Org. **46**: 793–799.

WIBOWO S., BAIMAI V. & R.G. ANDRE (1984): Differentiation of four taxa of the *Anopheles balabacensis* complex using H-banding patterns in the sex chromosomes. — Can. J. Genet. Cytol. **26**: 425–429.

WILLIAMS J.G.K., KUBELIK A.R., LIVAK K.J., RAFALSKI J.A. & S.V. TINGEY (1990): DNA polymorphisms amplified by arbitrary primers are useful as genetic markers. — Nucl. Acids Res. **18**: 6531–6535.

ZAHAR A.R., HILLS M. & G. DAVIDSON (1970): An attempt to group freshwater species of the *Anopheles gambiae* complex by some morphological larval and adult characters. — Parassitologia **12**: 31–46.

Anschrift des Verfassers:

Dr. rer. nat. Helge KAMPEN
Institut für Medizinische Parasitologie
Universität Bonn
Sigmund-Freud-Str. 25
D-53105 Bonn, Germany
E-Mail: hkampen@parasit.meb.uni-bonn.de